

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUDIANA CARDOSO DA SILVA

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA EM CÉLULAS DE
MELANOMA MURINO B16F1

CURITIBA

2017

LUDIANA CARDOSO DA SILVA

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA EM CÉLULAS DE
MELANOMA MURINO B16F1

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
e Molecular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Silva, Ludiana Cardoso da
Efeitos de nanopartículas de ouro e prata em células de melanoma murino B16F1. / Ludiana Cardoso da Silva. – Curitiba, 2017.
63 p.: il.

Orientador: Francisco Filipak Neto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Nanopartículas. 2. Melanoma. 3.Ouro. 4. Prata. I. Título. II. Filipak Neto, Francisco, 1981-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 571.6

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Examinador/Afiliação

Assinatura

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná



Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Charlie Antoni Miquelin
Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Suplente:

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a mestrand **Ludiana Cardoso da Silva**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeitos de nanopartículas de ouro e prata em células de melanoma murino B16F1", são de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de Fevereiro de 2017

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, criador, pelo dom da vida e pela infinita matéria de estudo que esta é. Por mais uma vez me surpreender com seus planos, permitindo-me realizar sonhos muito maiores do que os que eu poderia ter.

A minha família, pelo suporte e amor. Por sempre acreditarem no meu potencial. A minha avó Junia e tia Joice por me acolherem sob um teto mais próximo da universidade e não me deixarem faltar nada.

Ao meu amado, Vitor, pelo apoio emocional e prático. Por me ajudar a conciliar meus sonhos com minhas responsabilidades. Por tornar suportável os momentos difíceis, fazer eu me sentir invencível e me abençoar todos os dias.

As minhas colegas de graduação/mestrado e amigas para toda a vida, Melyssa e Marcelle. Pela companhia e por compartilharem comigo a grande aventura que é a pós-graduação. Por serem as melhores parceiras de estudo, e juntas, funcionarmos tão bem.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Celular, em especial aos companheiros do cultivo celular, por toda a troca de experiências, ajuda, e momentos divertidos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Filipak Neto, sempre exemplar e atento, desde minha iniciação científica. Pela compreensão e incentivo neste último ano, tão decisivo para mim.

Ao Prof. Dr. Arandi Bezerra pela colaboração e fornecimento das nanopartículas.

"DNA, partitura da vida
Vida, sinfonia divina
Deus, inigualável compositor
Viver, ballet espetaculoso
E eu, aprendiz de bailarina."

Ludiana Cardoso

RESUMO

A nanotecnologia é uma ciência em expansão. Dentre as suas aplicações, destaca-se o uso de nanopartículas (NPs) de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs). As propriedades das NPs favorecem a adsorção ou complexação com outros compostos e o carregamento destes para dentro das células, o que as tornam interessantes para aplicações na área biomédica. Faltam estudos sobre o impacto das NPs no ambiente e na saúde, e pouco se sabe a respeito dos seus efeitos sobre células cancerosas. O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo, devido à alta capacidade metastática. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos das NPs de ouro e prata em células de melanoma murino B16F1, com a hipótese de que esta exposição aumenta a malignidade das células tumorais, podendo influenciar a progressão da doença. As células B16F1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, transferidas para microplacas de cultura de 96 poços e expostas por 24 h às NPs. Foram estabelecidos 11 grupos experimentais, sendo eles: 5 concentrações para AuNPs e AgNPs (0,01; 0,1; 1; 10; e 100 ng.mL⁻¹) e um controle (contendo H₂O – veículo das NPs). As NPs utilizadas foram sintetizadas por ablação a laser e caracterizadas através das análises de UV-VIS e espalhamento dinâmico de luz - DLS. Após a exposição, foram realizados ensaios de viabilidade celular (vermelho neutro e azul de tripan), análise da atividade dos transportadores de efluxo de drogas (MDR), proliferação celular (cristal violeta), ciclo celular (iodeto de propídio), nível de espécies reativas de oxigênio (ensaio com diclorofluoresceína diacetato – DCF) e migração celular (*scratch*). A maior parte das partículas apresentou-se com tamanho de aproximadamente 2 nm. Como resposta à exposição, as células apresentaram aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, porém não foi detectada diferença em relação à viabilidade celular. Nos ensaios de proliferação celular foi observado o aumento em alguns grupos, mas este efeito não ocorreu quando o ensaio foi realizado com a sincronização prévia do ciclo celular. As maiores concentrações de AuNPs reduziram a atividade dos transportadores de efluxo de drogas. Houve uma diminuição de aproximadamente 2% do número de células na fase S nos grupos AgNPs 0,01 ng.mL⁻¹ e AuNPs 0,1 e 10 ng.mL⁻¹. Mais análises são necessárias para se entender este processo, mas o fato da exposição não afetar a viabilidade celular, migração e proliferação, além de reduzir a atividade dos transportadores de efluxo de drogas, vão contra a hipótese de que exposição a essas NPs aumente a malignidade das células de melanoma murino.

Palavras chave: nanopartículas, melanoma, viabilidade, proliferação, resistência a múltiplas drogas, espécies reativas de oxigênio, ciclo celular, migração celular.

ABSTRACT

Nanotechnology is an expanding science. Among its applications, there is the use of nanoparticles (NPs) of gold and silver. The properties of NPs may favor adsorption and complexation with other compounds that are carried into the cells, making NPs interesting for applications in the biomedicine. There are few studies about the impact of NPs on the environment and health, and less is known about these effects on cancer cells. Melanoma is the most aggressive type of skin cancer due to high metastatic capacity. The current study aimed to study the effects of gold and silver NPs on murine melanoma cells B16F1, with the hypothesis that this exposure increases the malignity of tumor cells, influencing on the progression of the disease. The B16F1 cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and onto 96-well microplates, and exposed for 24 h to NPs. A total of 11 experimental groups were established: 5 concentrations for both NPs (0.01, 0.1, 1, 10, and 100 ng.ml⁻¹) and the control (containing H₂O - vehicle for NPs preparation). The NPs used in here were synthesized by laser ablation and characterized by UV-VIS and dynamic light scattering (DLS). Following exposure, analyses of cell viability (neutral red and trypan blue), proliferation (crystal violet), cycle (propidium iodide) and migration (scratch), activity of drug-efflux transporters (MDR) and reactive oxygen species (dichlorofluorescein diacetate – DCF) were performed. The majority of nanoparticles had approximated 2 nm diameter. Exposure to NPs caused increased reactive oxygen species levels, but no effects on cellular viability. Cellular proliferation increased in some of the groups, but no effect occurred in prior cell cycle synchronized cells. The highest concentrations of AuNPs reduced the activity of drugs-efflux transporters. There was an approximated 2% reduction of the number of cells in the S-phase in AgNPs 0.001 ng.ml⁻¹ and AuNPs 0.1 and 10 ng.ml⁻¹ groups. Further analyses are necessary to understand this process. However, the fact of exposure had not affected cell viability, migration and proliferation, and yet had reduced the activity of drugs-efflux transporters, refutes the initial hypothesis that the exposure to these NPs can increase the malignity of murine melanoma cells.

Key words: nanoparticles, melanoma, viability, proliferation, multi-drug resistance, reactive oxygen species, cell cycle, cell migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferentes mecanismos de toxicidade causados pelas AgNPs	14
Figura 2 – ABCDE do Melanoma	17
Figura 3 – Auto-exame de pele	18
Figura 4 – Cultura de células B16F1	20
Figura 5 – Ablação a <i>laser</i>	24
Figura 6 – Banda típica de AgNPs esféricas	25
Figura 7 – Esquema experimental em microplaca de 96 poços	26
Figura 8 – Análise das imagens do ensaio clonogênico.....	33
Figura 9 – Espectro de absorção UV-VIS de AgNPs e AuNPs	34
Figura 10 – Tamanho (DLS) das AgNPs e AuNPs	35
Figura 11 – Viabilidade celular – vermelho neutro	36
Figura 12 – Viabilidade celular – azul de tripan	37
Figura 13 – Efluxo de drogas	39
Figura 14 – Proliferação celular - cristal violeta	41
Figura 15 – Ciclo celular – iodeto de propídio	42
Figura 16 – Fotografia – migração celular – <i>scratch</i>	45
Figura 17 – Gráfico – migração celular – <i>scratch</i>	46
Figura 18 – Espécies reativas de oxigênio	48
Figura 19 – Clonogênico – número de colônias	51
Figura 20 – Clonogênico – área média das colônias	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. NANOPARTÍCULAS	9
2.1.1 Nanopartículas de ouro (AuNPs)	11
2.1.2. Nanopartículas de prata (AgNPs).....	13
2.2. MELANOMA	15
2.2.1 Linhagem de células B16F1	19
3. PERGUNTA.....	20
4. HIPÓTESE.....	20
5. JUSTIFICATIVA	21
6. OBJETIVO GERAL	22
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS	22
7 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
7.1. CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM B16F1	22
7.2. Síntese E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	23
7.2.1. Síntese das nanopartículas.....	23
7.2.2. UV-Vis	24
7.2.3 Espalhamento dinâmico de Luz – DLS	25
7.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	26
7.4. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR.....	27
7.4.1. Vermelho Neutro.....	27
7.4.2. Azul de Tripan.....	28
7.5. ATIVIDADE DE TRANSPORTADORES de efluxo de drogas	28
7.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR - CRISTAL VIOLETA.....	29
7.7. CICLO CELULAR	30
7.8. ENSAIO DO <i>SCRATCH</i>	31
7.9. NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	31
7.10. ENSAIO CLONOGÊNICO.....	32
7.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	33
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
8.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	33
8.1.1. UV-vis	33
8.1.2 Espalhamento dinâmico de luz - DLS	34
8.2. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	35
8.3. ATIVIDADE DE TRANSPORTADORES de efluxo de drogas	38
8.4. PROLIFERAÇÃO CELULAR - CRISTAL VIOLETA.....	40
8.5. CICLO CELULAR	42
8.6. ENSAIO <i>SCRATCH</i>	44
8.7. NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	48
8.8. ENSAIO CLONOGÊNICO.....	50
8.9 RESUMO DOS RESULTADOS.....	53
9. CONCLUSÕES	55
10. PERSPECTIVAS FUTURAS	55
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Em meados de 2005 os primeiros produtos compostos por nanomateriais começaram a ser comercializados. Desde então, o mercado nanotecnológico tem se expandido de forma exponencial e ampliando suas aplicações para as mais diversas áreas (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2017). Contudo, ainda há muito a se descobrir a respeito do potencial tóxico das partículas, bem como dos seus efeitos crônicos no meio ambiente e nos organismos vivos.

A amplitude e recenticidade do universo nanotecnológico inevitavelmente deixam lacunas quanto à segurança dos nanomateriais e a regulamentação destes representa um enorme desafio para as agências competentes (SEATON *et al.*, 2010).

A exposição a substâncias desconhecidas pode representar um grande risco para a saúde e o ambiente. Além disso, o risco de exposição a estas substâncias por pessoas já enfermas e a possibilidade destas substâncias perturbarem a dinâmica do tratamento pode se tornar um fator agravante no prognóstico de doenças. Tendo em vista este problema, este trabalho buscou avaliar se a exposição às nanopartículas de ouro e prata causa algum efeito sobre a malignidade de células de melanoma murino.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. NANOPARTÍCULAS

Nanopartícula é por definição uma subclassificação de partícula ultrafina com comprimentos em duas ou três dimensões superiores a 1 nanômetro e menores que 100 nanômetros, com propriedades emergentes relacionados ao seu tamanho (ASTM *International*, 2012). Elas podem ser formadas espontaneamente na natureza como produtos da combustão incompleta de combustíveis fósseis e erupção vulcânica (NOWACK e BUCHELI, 2007). No entanto, nas duas últimas décadas elas vêm sendo

produzidas industrialmente e em larga escala, graças ao desenvolvimento da nanotecnologia (EPA, 2007).

O projeto chamado *Project on Emerging Nanotechnologies* mantém um inventário - *Consumer Products Inventory* (CPI) - com informações sobre 1317 produtos nanotecnológicos disponíveis para consumo no mercado registrados até o ano de 2011. De 2006 até 2011, o número de produtos registrados contendo nanomateriais cresceu cerca de 520%. Os Estados Unidos da América são o maior fabricante de produtos nanotecnológicos, seguidos pela Europa e Ásia (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2017). Estima-se que na China mais de 1.000 toneladas de nanopartículas metálicas foram produzidas entre 2012-2013 (GAO *et al.*, 2013).

Há uma grande variedade de nanopartículas (NPs) sendo desenvolvidas e aplicadas. Estas aplicações vão desde a indústria eletrônica, passando pela cosmética e têxtil, até a biomédica que, por sua vez, tem levantado a possibilidade do emprego das nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs), tanto no diagnóstico quanto no tratamento do câncer (GRANMAYEH RAD; ABBASI; AFZALI, 2011; RAVINDRAN; CHANDRAN; KHA, 2013).

Contudo, o comportamento destas NPs em sistemas biológicos ainda não é totalmente esclarecido. Os primeiros trabalhos enfatizando a nanotoxicologia surgiram a partir de 2004 (WEB OF SCIENCE, 2014) e por ser um tema recente, os efeitos da exposição às nanopartículas sobre a saúde humana e ambiental são desconhecidos. O que se sabe é que as mesmas propriedades que as tornam úteis têm potencial de torná-las tóxicas. As nanopartículas são capazes de atravessar a membrana plasmática por difusão ou endocitose (REJMAN *et al.*, 2004). Além disso, suas propriedades físico-químicas permitem complexação com outros compostos, que podem eventualmente ser carregados para o interior da célula (REJMAN *et al.*, 2004).

Considerando o aumento da produção e utilização destas NPs, é preocupante e inevitável que resíduos nanotecnológicos sejam encontrados no meio ambiente, expondo os humanos, além dos demais seres vivos, a esta nova classe de contaminantes emergentes.

A exposição às NPs pode ocorrer de forma ocupacional ou ambiental, e a absorção geralmente ocorre através da inalação, da ingestão ou do contato com a pele. No tocante à nanomedicina, a via intravenosa e subcutânea são as vias de exposição mais importantes (ZHAO; CASTRANOVA, 2011).

A absorção de NPs pela via dérmica pode ser quantitativamente menor em relação às vias respiratória e oral (ZHAO; CASTRANOVA, 2011), mas ainda assim, representa um via importante no campo da nanomedicina. A pele faz a primeira barreira de contato do corpo humano com o meio externo sendo, portanto, o órgão mais acessível e exposto ao ambiente. Em se tratando da absorção de NPs pela pele, há variáveis que influenciam a entrada pela via dérmica, como gênero e idade do indivíduo exposto, abertura dos poros ou estímulos mecânicos na pele deste, bem como carga elétrica da partícula em questão (HAGENS *et al.*, 2007).

2.1.1 Nanopartículas de ouro (AuNPs)

O uso de soluções coloidais de ouro ocorre desde o século V a.C., no Egito e China, onde eram administradas para fins terapêuticos e estéticos. Na idade média, essas soluções eram recomendadas para tratamento de problemas no sistema digestório, doenças sexualmente transmissíveis e tumores (BRUNDLE; EVANS; WILSON, 1992).

Tradicionalmente, o ouro é classificado como um metal estável, considerado um material biocompatível e resistente à oxidação. Porém, é importante considerar que as propriedades de um material em macroescala podem ser bem distintas quando este se apresenta em nanoescala. Além disso, AuNPs são capazes de modular a atividade e comportamento celular, mediante interações com receptores de superfície celular (BODELÓN *et al.*, 2017).

Há grande expectativa quanto às possíveis aplicações biomédicas das nanopartículas de ouro, que incluem seu emprego como biossensores, agentes antimicrobianos, agentes para purificação de água contaminada por mercúrio, veículo de entrega de drogas e, até mesmo, ferramenta no diagnóstico e combate de doenças como HIV e câncer (GRANMAYEH RAD; ABBASI;

AFZALI, 2011). A atividade microbicida das AuNPs deve-se à forte atração eletrostática causada pelo potencial de membrana da membrana plasmática (CHAMUNDEESWARI *et al.*, 2010; JOHNSTON *et al.*, 2010). Sendo assim, a carga elétrica torna-se outro fator que influencia as propriedades das NPs. Já foi observado que NPs catiônicas apresentam potencial tóxico moderado, diferente das NPs aniônicas, que não têm efeito tóxico (GOODMAN *et al.*, 2004).

É vasta a aplicabilidade das AuNPs no campo biomédico. Porém, o grande apelo da indústria é o emprego de AuNPs em cosméticos. Dos produtos contendo AuNPs listados no inventário CPI, 68% são produtos destinados aos cuidados pessoais e possuem a via dérmica como potencial via de exposição (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2017).

Larese *et al.* (2011) estudaram a capacidade de AuNPs penetrarem a pele humana intacta e lesionada através do método de Franz. As doses aplicadas foram de 15 e 45 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ com um período de exposição de 24 h. A absorção apresentou caráter dose-dependente, e através de microscopia eletrônica e espectrometria de massas com fonte de plasma induzido encontraram AuNPs presentes na derme e epiderme.

Mas a via dérmica é apenas uma das diversas vias de exposição. Uma vez dentro do organismo, é necessário conhecer os possíveis efeitos das NPs no organismo. A fim de analisar a citotoxicidade das AuNPs, Pan *et al.* (2007) avaliaram a exposição de quatro linhagens de células, dentre elas, as células de melanoma SK-Mel-28. Foram utilizadas AuNPs de 0,8 a 15 nm, sendo que partículas de 1,4 nm causaram a morte celular por necrose dentro de 12 h e partículas de 1,2 nm provocaram a morte celular por apoptose, apontando para o tamanho das NPs como outra variável capaz de gerar diferentes respostas celulares para uma NP do mesmo material.

Cho *et al.* (2009) avaliaram os efeitos tóxicos de AuNPs de 13 nm de diâmetro conjugadas a polietilenoglicol em camundongos e observaram a indução de processo inflamatório agudo e apoptose no fígado, além da acumulação destas NPs no fígado e baço até 7 dias após a exposição.

Organismos aquáticos também foram contemplados em estudos envolvendo AuNPs. Em estudos com mexilhões (*Mytilus edulis*) expostos por

24 h a $0,75 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de AuNPs (~ 5 nm de diâmetro) foi observado aumento da peroxidação lipídica e perda da estabilidade da membrana lisossomal (TEDESCO *et al.* 2010; TEDESCO *et al.* 2013).

Além das diversas possibilidades de conjugação, as AuNPs podem ter suas características alteradas de acordo com o método de síntese. Os métodos mais comuns são os processos termolíticos e fotoquímicos, a síntese química com reações tais como a geração de nanopartículas de ouro em um meio aquoso utilizando citrato ou boro hidreto de sódio como agente redutor, a tecnologia de fluido supercrítico ou até mesmo por métodos biológicos que utilizam fungos e bactérias como uma alternativa ao uso de solventes orgânicos (KHAN; VISHAKANTE; SIDDARAMAIAH, 2013).

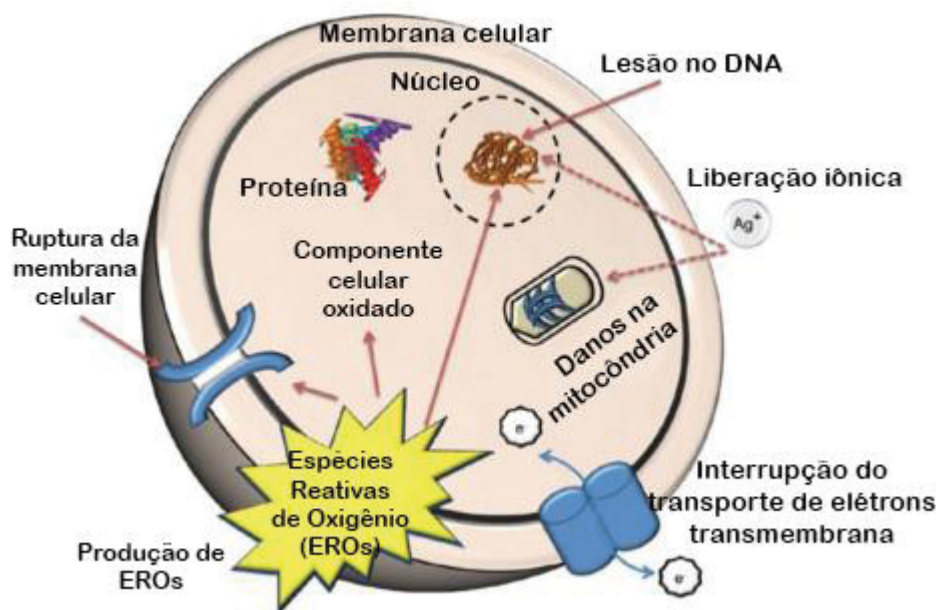
2.1.2. Nanopartículas de prata (AgNPs)

As AgNPs sobressaem-se em relação ao número de produtos disponíveis no mercado, seguidas pelas NP de carbono, titânio, sílica e ouro. Dos milhares de produtos nanotecnológicos disponíveis para consumo no mercado, as nanopartículas de prata representam 25% destes. E mais de 30% dos produtos contendo AgNPs listados no CPI têm como principal via de exposição a derme (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2017).

Para investigar a absorção de AuNPs pela via dérmica, Larese *et al.* (2009) aplicaram um sistema *in vitro* de difusão celular (método de Franz) e através microscopia eletrônica relataram que há absorção de AgNPs baixa na pele intacta, e mais pronunciadamente na pele lesionada. AgNPs foram detectadas no estrato córneo através de microscopia eletrônica (LARESE *et al.*, 2009).

As AgNPs também se destacam por sua atividade antimicrobiana. Em comparação às outras NPs, as AgNPs são mais efetivas contra fungos, bactérias e vírus. Estudos mostram que AgNPs interferem na cadeia respiratória das células e na divisão celular, causando morte (FIGURA 1) .

FIGURA 1



FONTE: GALDIERO *et al.*, 2014 (Adaptada). Representação dos possíveis mecanismos de toxicidade causados pelas AgNPs contra microrganismos. Comumente ocorre a liberação gradual de íons de prata, que acarretará em danos na mitocôndria, afetando a produção de ATP. Também pode ocorrer intercalação no DNA, comprometendo a replicação. Danos diretos à membrana plasmática, ou indiretos através da geração de espécies reativas de oxigênio e disfunção de proteínas pela interação com grupos tióis.

Gao *et al.* (2013) estimaram um aumento na demanda pela produção de AgNPs na China, de até 366 toneladas em 2014 em comparação com 45 toneladas em 2008, somente para aplicação como microbicida. Mas as AgNPs não se limitam a este fim; elas estão presentes em eletrônicos, eletrodomésticos, cosméticos, embalagens de alimentos, roupas esportivas, brinquedos, dispositivos médicos, produtos de limpeza e de higiene pessoal entre diversos outros (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2017).

Considerando as tantas aplicações de AgNPs, surge também a preocupação com seus efeitos no organismo. Estudos *in vitro* demonstraram que células expostas a AgNPs apresentaram alterações morfológicas, sinais claros de estresse oxidativo (redução de níveis de glutathiona (GSH) e atividade da superóxido dismutase (SOD)), bem como o aumento da peroxidação lipídica, além de fragmentação de DNA, sendo detectada apoptose inclusive

em grupos expostos a concentrações baixas (ARORA; JAIN; RAJWADE, 2008; LIU *et al.*, 2010).

O impacto das AgNPs nos ecossistemas aquáticos também tem recebido atenção. Colman *et al.* (2014) verificaram que as AgNPs em plantas aquáticas foram tão tóxicas quanto a prata iônica (Ag^+), um contaminante preocupante já conhecido.

Kim *et al.* (2009) estudaram a distribuição de AgNPs nos tecidos em ratos Fischer 344 após exposição via oral ou inalatória e demonstraram acúmulo dose-dependente em todos os tecidos examinados: testículos, rins, fígado, cérebro, pulmão e sangue.

Braydich-Stolle *et al.* (2005) estudaram o efeito de AgNPs *in vitro* em células germinativas masculinas (C18-4) expostas a concentrações de 5 à 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ por 48 h e mostraram que AgNPs induziram necrose e apoptose nestas células, revelando potencial toxicidade reprodutiva. AgNPs (5-35 nm) também foram contemplada em estudos embriotóxicológicos e comparada às AuNPs (15-35 nm) e NPs de platina, foram mais tóxicas para desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* (ASHARANI *et al.*, 2011). Em contrapartida, as AuNPs não apresentaram efeito tóxico (ASHARANI *et al.*, 2011). Estes dados revelam a necessidade de aprofundamento nas investigações dos efeitos tóxicos destas nanopartículas.

2.2. MELANOMA

O melanoma cutâneo resulta de um crescimento descontrolado de melanócitos localizados na camada basal da epiderme. Melanócitos normais ficam isolados uns dos outros, cercados por 5-8 queratinócitos. Quando há perda do controle da proporção de melanócitos/queratinócitos, os melanócitos tornam-se células névicas (POLLOCK, 2002).

As aberrações celulares que transformarão o nevo em um melanoma incluem alterações moleculares relacionadas à adesão célula-célula e célula-matriz e comunicação célula-célula (envolvendo E-caderina/N-caderina, e integrinas), que estão relacionadas com a capacidade da célula migrar do seu local de origem e invadir outros tecidos, bem como o desenvolvimento de autonomia na produção de fatores de crescimento (que levará ao aumento

proliferação celular), além de diversas anormalidades de ordem genéticas (POLLOCK, 2002).

No Brasil, o câncer de pele corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados, dos quais o melanoma representa apenas 3%. Contudo, o melanoma é considerado o mais agressivo dos cânceres de pele devido a sua alta capacidade metastática sendo predominante em adultos de pele branca (INCA, 2017).









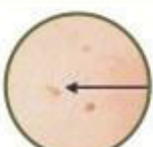
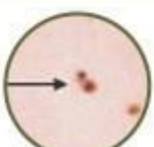
A taxa de incidência do melanoma no Brasil é de 3,0 (homens) e 2,67 (mulheres) a cada 100 mil habitantes, sendo a região Sul do país a mais afetada por pela doença. O número de mortes causadas por melanoma registrado pelo Sistema de Informação sobre Mortalidade no ano de 2013 foi de 1.547 mortes, sendo 903 homens e 644 mulheres (INCA, 2017).

A causa do melanoma é multifatorial, mas há alguns fatores de risco que podem contribuir para o desenvolvimento deste câncer. O maior deles é a exposição à luz ultravioleta (UV), capaz de causar danos irreversíveis no DNA. A luz do Sol é a maior fonte de radiação UV. Câmaras de bronzeamento artificial e luminárias solares usadas em jardinagem também emitem raios UV (AMERICA CANCER SOCIETY, 2016).

Outros fatores de risco para os quais se devem atentar são o histórico pessoal e familiar do melanoma (ou de outros cânceres), o sistema imunológico suprimido (seja por alguma doença, ou medicação), o aparecimento de nevos e sardas (efélides) e a idade avançada (AMERICA CANCER SOCIETY, 2016).

O prognóstico do melanoma pode ser considerado bom, se o diagnóstico e tratamento ocorrerem nos estágios iniciais da doença. Porém, quando em estado avançado, a sobrevida estimada é de 6-9 meses (INCA, 2017). Para detecção inicial deste tipo de câncer, é importante o conhecimento do ABCDE do melanoma para que os indivíduos possam aplicá-lo no auto-exame de pele, e procurar assistência médica o mais cedo possível quando notarem alterações (FIGURA 2).

FIGURA 2

NORMAL		CANCEROUS
	"A" de Assimetria <ul style="list-style-type: none"> Se você desenhar uma linha no meio do nevo, as metades do melanoma não terão o mesmo tamanho. 	
	"B" de Borda <ul style="list-style-type: none"> As bordas de um melanoma inicial tendem a ser irregulares. 	
	"C" de Cor <ul style="list-style-type: none"> Manchas benignas têm cor uniforme. Variações de cor, especialmente branca ou azul são ruins. 	
	"D" de Diâmetro <ul style="list-style-type: none"> Melanomas geralmente possuem mais de 6 mm de diâmetro, embora possam ser menores. 	
	"E" de Evolução <ul style="list-style-type: none"> Quando um nevo muda de tamanho, forma ou cor, ou começa a sangrar ou escamar, pode ser perigoso. 	

FONTE: CANCER WORLD, 2017 (Adaptada). Exemplos fotográficos do ABCDE do melanoma.

O ABCDE do melanoma consiste em cinco características que podem indicar algum risco de malignidade em nevo na pele: A = Assimetria - geralmente lesões malignas possuem forma assimétrica, ao contrário de nevos benignos, que costumam ser simétricos. B = Bordas - lesões típicas de melanoma possuem borda irregular, difíceis de serem definidas. C = Cor - manchas na pele com distribuição irregular da cor e a presença de mais de uma cor (azul, preto, marrom, laranja etc) podem ser características de melanoma. Geralmente nevos benignos possuem um único tom de marrom ou laranja. D = Diâmetro - lesões originadas do melanoma costumam ultrapassar 6 mm de diâmetro. Na prática, recomenda-se no auto-exame verificar se o nevo não ultrapassa o diâmetro de um lápis (aproximadamente 7 mm). E = Evolução

- este é o aspecto mais importante a considerar. Rotineiramente deve-se avaliar se o nevo sofre qualquer alteração de suas características (MELANOMA RESEARCH FOUNDATION, 2017).

Coups *et al* (2016) avaliaram a rotina de auto-exame de pacientes diagnosticados com melanoma. Apenas 14,2% dos pacientes haviam examinado o corpo inteiro nos últimos dois meses. Destes, nem todos usaram um espelho de corpo inteiro (13,4%), um espelho de mão (11,3%) ou pediram a ajuda de alguém (9,2%) enquanto se examinavam. Estes resultados revelam como é necessária a promoção e incentivo da prática do auto-exame de pele (FIGURA 3).

FIGURA 3

Deteção inicial do melanoma é essencial para um melhor prognóstico

Nos estágios iniciais, o melanoma pode ser removido com sucesso e monitorado através de auto-exames de pele. Na verdade, a taxa de sobrevivência pode aumentar 90 a 95% se detectado no início. Contudo, em estágios avançados, o melanoma pode ser fatal. A taxa de sobrevivência é menor que 20% quando o melanoma invade outros órgãos. Aumente suas chances de detectar o melanoma no início examinando cuidadosamente sua pele uma vez ao mês.

Você vai precisar: uma boa iluminação, um espelho de corpo inteiro, um espelho de mão, cadeira e secador de cabelo.



FONTE: MELANOMA RESEARCH FOUNDATION, 2017. Instruções para auto-exame de pele. É importante usar espelhos para examinar regiões que se encontram fora do alcance da visão, e não deixar de examinar nenhuma área da pele.

Para tratamento do melanoma, comumente é indicada quimioterapia com dacarbazina (LENS; EISEN, 2003). Porém, este câncer possui uma taxa

de resposta ao tratamento situada em torno de 5-20% (KIM *et al.*, 2010). A eficácia da quimioterapia é prejudicada pela resistência (intrínseca ou adquirida) das células tumorais.

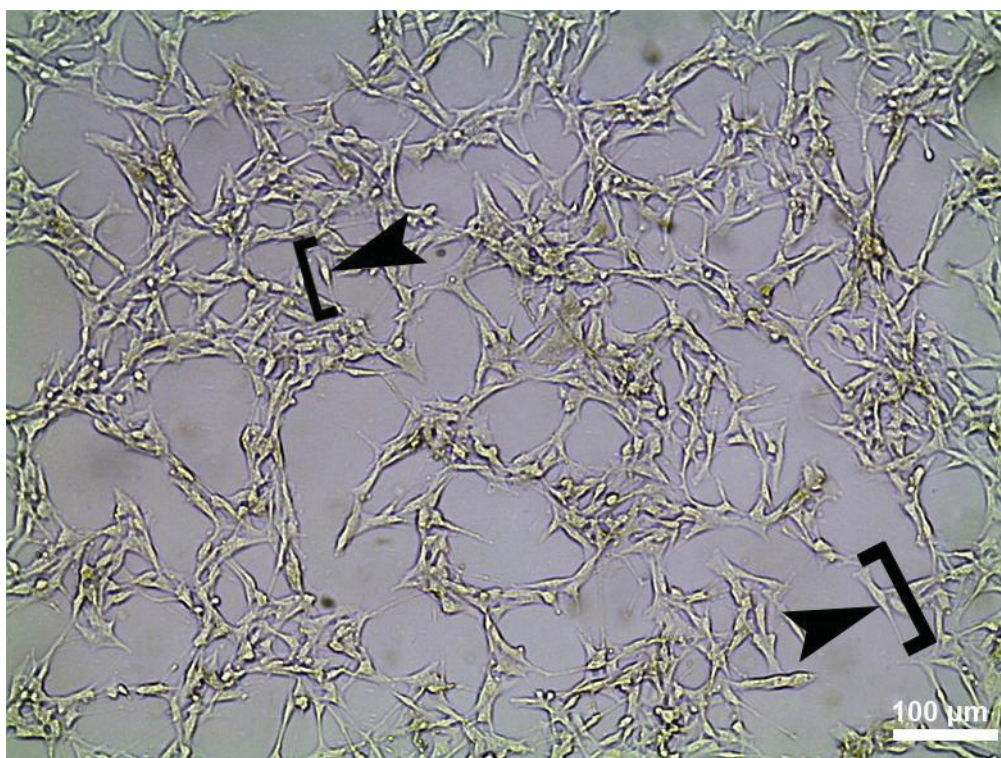
Este fenômeno é denominado ‘resistência a múltiplas drogas’ ou ‘resistência a múltiplos xenobióticos’ (MDR – *multi-drug resistance* ou MXR – *multi-xenobiotic resistance*), e pode surgir através de vários mecanismos distintos, incluindo alterações em pontos de checagem do ciclo celular, comprometimento das vias apoptóticas ou dos mecanismos de reparo de danos (LA PORTA, 2009).

Outro mecanismo recorrente é o aumento do efluxo de fármacos citotóxicos mediado por uma classe de transportadores dependentes de energia, conhecidos como transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Estes transportadores expulsam a droga do interior da célula, impedindo o acúmulo. Desta forma, a droga não atinge a concentração tóxica necessária para ocasionar a morte das células tumorais (GOTTESMAN, FOJO; BATES, 2002).

2.2.1 Linhagem de células B16F1

As células B16F1 foram isoladas a partir de melanoma de camundongo (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6J. São células epiteliais fusiformes e aderentes, com uma menor capacidade metastática em relação às células da linhagem B16F10 (ATCC, 2014) e liberam grânulos de melanina (FIGURA 4). Estas células vêm sendo amplamente utilizadas em estudos *in vitro* e podem também ser empregadas como modelo de estudo *in vivo* através da inoculação em camundongos (FIDLER, 1973).

FIGURA 4



FONTE: O Autor (2016). Cultura de células B16F1, 48 h após re-plaqueamento. Setas apontam células B16F1.

3. PERGUNTA

Exposição a nanopartículas de ouro e prata é capaz de modular características importantes das células B16F1, como sobrevivência, proliferação, atividade dos transportadores de efluxo de drogas e migração, podendo assim aumentar a malignidade do melanoma?

4. HIPÓTESE

Nanopartículas de ouro e prata são capazes de atuar sobre as células tumorais B16F1, e esta exposição afeta a malignidade das células tumorais ao torná-las resistentes ao estresse químico, podendo influenciar a progressão da doença.

5. JUSTIFICATIVA

Os resíduos oriundos da produção e do descarte de produtos contendo AgNPs e AuNPs inevitavelmente alcançam o ambiente (PÉREZ; LA FARRÉ; BARCELÓ, 2009). Além da preocupação com a contaminação ambiental e a exposição proveniente desta, estas nanopartículas podem entrar em contato direto com a pele através de diversos produtos específicos já comercializados (bandagens e pomadas microbidas, roupas esportivas, meias, tecidos impermeabilizados, cosméticos e produtos de higiene pessoal) (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2017), o que reforça a importância de estudar a relação entre o melanoma e a exposição a estes nanomateriais.

Já existe uma grande discussão na comunidade acadêmica sobre o potencial carcinogênico de contaminantes ambientais. Decorrente disto, ao redor do mundo há uma busca incessante pelo desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos e descoberta de agentes terapêuticos mais eficientes contra o câncer. Porém, não se pode negligenciar a situação de pacientes já acometidos pela doença, e que em muitos casos, não tem sucesso no tratamento devido a fatores pouco conhecidos (KIM *et al.*, 2010).

A ideia de que a exposição a contaminantes ambientais possa potencializar a malignidade de células tumorais é preocupante e relevante, já que isto pode atrapalhar o tratamento, favorecendo a progressão da doença. Também não deve ser ignorado o fato de que, da mesma forma em que ocorrem interações medicamentosas no organismo, a capacidade de alguns contaminantes interagirem com drogas não pode ser descartada (FARDEL; KOLASA; LE VEE, 2012), de modo que a exposição de pacientes a esses contaminantes poderia interferir no tratamento quimioterápico e afetar o prognóstico.

Essa é uma questão sem precedentes na literatura, que merece atenção, particularmente quando se trata de contaminantes emergentes como as nanopartículas, cujo potencial tóxico e comportamento em sistemas biológicos são pouco esclarecidos, e que já são largamente comercializados e considerados para possíveis aplicações biomédicas.

6. OBJETIVO GERAL

• Investigar se as nanopartículas de prata e ouro influenciam características das células de melanoma associadas a sua malignidade.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS

- Empregar a linhagem B16F1 como modelo de investigação dos efeitos das nanopartículas de ouro e prata em células de melanoma;
- Verificar a viabilidade celular;
- Verificar a proliferação celular;
- Analisar o ciclo celular;
- Avaliar a atividade de transportadores de efluxo de drogas envolvidos com o mecanismo de resistência a multidrogas (MDR);
- Avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio;
- Analisar a migração celular;
- Analisar a capacidade de formação de colônias.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1. CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM B16F1

Alíquotas de células da linhagem B16F1 (células de melanoma murino) obtidas comercialmente (Banco de Células do Rio de Janeiro) foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², com meio DMEM (*Dulbecco's Minimum Essential Medium*, pH 7,4; 4500 mg.l⁻¹ de glicose; 3700 mg.l⁻¹ de bicarbonato de sódio), esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 40 µg.ml⁻¹ de gentamicina.

Para o crescimento e adesão, as células permaneceram em estufa a 37 °C e pCO₂ de 5%, com trocas de meio realizadas a cada 48 h. No decorrer do

processo de expansão das células, ocorreram as passagens para garrafas maiores (75 cm² e 150 cm²) ao atingirem cerca de 70% de confluência, até se obter a quantidade de células necessária para execução dos experimentos.

Para obter as células em suspensão, elas foram dissociadas da superfície da garrafa de cultivo. Para isso foi utilizada a solução enzimática de tripsina-EDTA (tripsina 0,25%, EDTA 0,02%, em PBS, pH 7,3) por um período de 2 a 5 min – tempo geralmente suficiente para que as células soltem da superfície dos frascos de cultura. Em seguida, acrescentou-se meio de cultura suplementado com soro fetal bovino, a fim de inativar a ação da tripsina. A suspensão foi subcultivada para uma nova garrafa de cultura, sendo adicionado meio de cultura com suplementações (10% SFB e antibióticos).

Ao obter a quantidade de células suficiente para a realização dos experimentos, as células foram tripsinizadas e contadas com o auxílio de uma câmara de *Neubauer* em um microscópio de luz invertido. Em seguida, as células foram plaqueadas em microplacas de cultura de 96 poços, na razão de 8000 células por poço (número que fornece a quantidade de células necessárias para a formação de uma monocamada no fundo do poço, sem amontoamento de células até o dia da análise – 48 h após o plaqueamento) e foram cultivadas por 24 h. Após este período, as células foram expostas às nanopartículas.

Todos os reagentes usados nos procedimentos foram pré-aquecidos em banho-Maria a 37 °C.

7.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

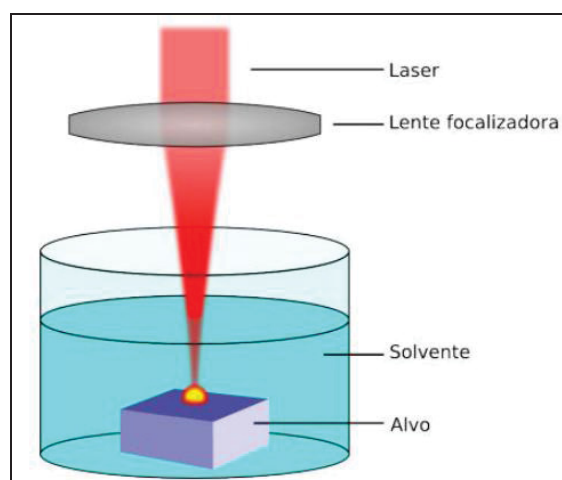
7.2.1. Síntese das nanopartículas

As NPs foram obtidas através da colaboração existente com pesquisador Arandi G. Bezerra Jr. (Laboratório de Pesquisa de Aplicação de Nanopartículas - FotoNanoBio - Universidade Tecnológica Federal do Paraná). Estas NPs foram sintetizadas pelo método de ablação a laser em meio líquido, que permite a produção de nanoestruturas de forma rápida e com impacto

ambiental reduzido, evitando a formação de resíduos, pois dispensa a utilização de reagentes químicos.

Esta técnica consiste na focalização de um feixe laser pulsado de alta potência na superfície de um alvo sólido com alto grau de pureza (Au e Ag neste caso) imerso em solvente (água bidestilada estéril). O esquema da montagem experimental é exibido na FIGURA 5.

FIGURA 5



FONTE: TEIXEIRA ROSA, 2014. - Esquema da montagem utilizada para realização da ablação a laser.

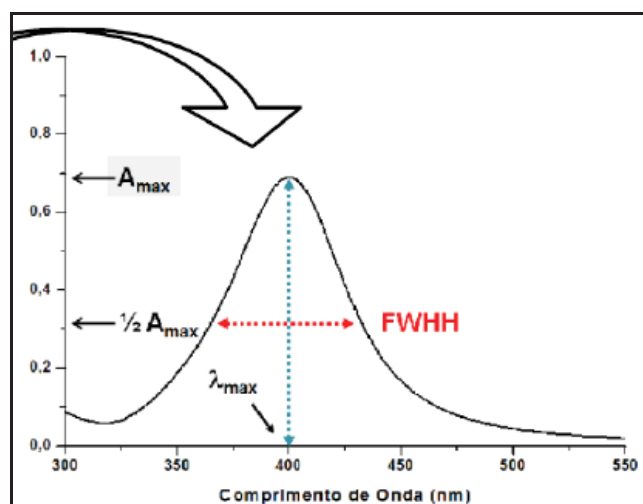
7.2.2. UV-Vis

A Espectroscopia Ultravioleta-visível (UV-Vis) é comumente utilizada para estudar a cinética de formação de NPs em solução, bem como o tamanho das partículas. Essa metodologia fornece dados sobre a interação da luz com a amostra dentro da faixa do espectro que vai de 200 nm a 1025 nm.

Este método permite uma análise rápida quanto à quantidade, tamanho e polidispersidade das NPs. A análise dos resultados é realizada com base nos gráficos gerados a partir da aferição dos valores de absorbância máxima ($A_{\text{máx}}$), comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) e largura a meia-altura (FWHH, do inglês *full width at half-height*) (FIGURA 6). O valor de $A_{\text{máx}}$ está relacionado ao número de partículas formadas e FWHH (a largura do pico representado no gráfico) fornece dados sobre a polidispersidade (LINK; ELSAYED, 1999). Já $\lambda_{\text{máx}}$ está relacionado ao tamanho das NPs, sendo que se

observa um deslocamento para o vermelho deste valor com o aumento no tamanho das NPs (JAIN *et al.*, 2008). AgNPs e AuNPs coloidais possuem tipicamente uma coloração amarela e roxa, respectivamente, que corresponde ao espectro resultante da absorção de fótons com comprimento de onda em torno de 400 nm (AgNPs) e 520 nm (AuNPs).

FIGURA 6



FONTE: SIGNORI, 2010. Banda típica de AgNPs esféricas.

Inicialmente, é medido o espectro da luz transmitida pelo solvente, no qual as partículas foram produzidas, em uma cubeta de quartzo para que este sinal seja utilizado como referência. Então, é medido o espectro da luz transmitida através do coloide em estudo e a quantidade de luz absorvida é dada em termos de absorbância.

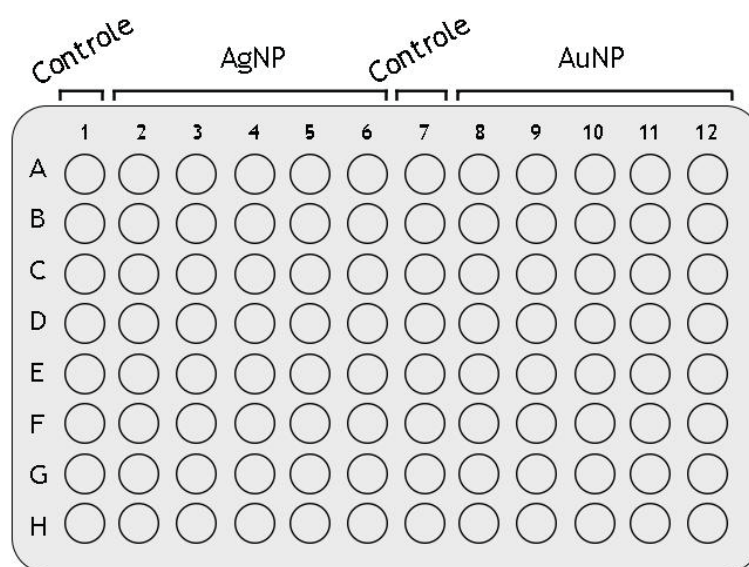
7.2.3 Espalhamento dinâmico de Luz – DLS

A medida do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) informa o tamanho das partículas suspensas em meio líquido (BERNE; PECORA, 2000). Nesta técnica, um laser incide sobre a amostra e a intensidade do feixe espalhado por um ângulo θ é medida ao longo do tempo.

7.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Com base em concentrações previstas de AuNPs e AgNPs em água no ambiente de 0,14 e 0,01-0,03 ng.mL⁻¹, respectivamente (PÉREZ; LA FARRÉ; BARCELÓ, 2009), foram selecionadas 5 concentrações para AuNPs e AgNPs (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 ng.mL⁻¹), de modo a simular uma exposição a doses baixas (como as previstas na água) e doses mais elevadas (como as resultantes do emprego de produtos com NPs sobre a pele). Ao todo foram 10 grupos expostos as NPs e mais um controles do experimento (meio de cultura com acréscimo de 0,24% de H₂O — correspondente ao volume da suspensão de NPs dos grupos expostos). O tempo de exposição foi de 24 h. Foram realizados três experimentos independentes com oito replicatas para cada grupo (FIGURA 7), para cada uma das análises descritas nos tópicos seguintes.

FIGURA 7



FONTE: O Autor. Esquema experimental da exposição das células em microplaca de 96 poços.

7.4. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

7.4.1. Vermelho Neutro

O teste de Vermelho Neutro (VN) é uma análise colorimétrica para quantificação da integridade do sistema endolisossomal. O ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis de incorporar e assimilar o reagente dentro dos endossomos e lisossomos. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco, que penetra prontamente na membrana celular e se acumula intracelularmente nos endossomos e lisossomos, onde se combina com a parte aniônica da matriz (SVENDSEN *et al.*, 2004).

Mudanças na superfície celular ou na membrana lisossômica levam a fragilidade lisossômica e outras mudanças que se tornam gradativamente irreversíveis. Tais alterações ocorridas pela ação de xenobióticos resultam na diminuição da retenção do Vermelho Neutro. Assim, é possível distinguir células viáveis de danificadas ou mortas. A quantidade de corante incorporado às células é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta (SVENDSEN *et al.*, 2004).

Após o período de exposição aos contaminantes, o teste do vermelho neutro foi realizado para determinar a viabilidade celular. Os poços foram lavados com PBS estéril e a eles foram adicionados 200 µl da solução de vermelho neutro (reagente diluído em meio de cultura numa concentração de 100 µg.mL⁻¹). Após um período de incubação de 3 h em estufa a 37°C e pressão parcial pCO₂ de 5%, os poços foram lavados 3 vezes com solução de formol (0,5% em água) e cloreto de cálcio (0,1%) para remoção do reagente não incorporado e fixação das células.

Em seguida, 300 µl de solução de ácido acético a 1% e etanol a 50% foram adicionados para extração do corante. Após 15 min de repouso em temperatura ambiente, o conteúdo dos poços foi homogeneizado para ressuspensão do corante. Por último, 200 µl do sobrenadante foram transferidos para outra microplaca de 96 poços para quantificação da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

7.4.2. Azul de Tripan

O princípio deste método é baseado na capacidade de células viáveis excluírem o corante vital azul de tripan do seu interior, diferenciando-as de células não viáveis, cuja integridade da membrana plasmática foi perdida. Os danos na membrana permitem a difusão do corante para dentro das células, que podem ser identificadas por ficarem coradas de azul. Já as células viáveis, bloqueiam a passagem do corante e preservam a aparência refringente (PHILLIPS 1973; TORTORELLO 2014).

Findado o período de exposição aos contaminantes, o sobrenadante de cada um dos grupos foi recolhido. Em seguida, as células foram desaderidas com tripsina. As células obtidas nesta suspensão foi somada aos respectivos sobrenadantes reservados para serem centrifugadas a $280 \times g$ por aproximadamente 3 min. O *pellet* de células formado foi ressuspendido em solução de corante azul de tripan (0,04%, Sigma®), e após 1 min de incubação, foram preparadas duas lâminas para cada amostra com uma gota da suspensão sobreposta por lamínula de vidro. Foram capturadas imagens de 4 campos diferentes de cada lâmina com auxílio de um microscópio invertido (objetiva de 20X). A análise foi feita a partir das imagens capturadas, através das quais as células foram contadas. A porcentagem de viabilidade foi determinada através da equação:

$$\frac{\text{número total de células} - \text{número de células coradas}}{\text{número total de células}} \times 100$$

7.5. ATIVIDADE DE TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS

O método baseia-se no efluxo da rodamina B pelos transportadores de efluxo de drogas (associados ao fenótipo MDR), de modo que quanto maior a quantidade do fluoróforo dentro da célula, menor a atividade destes transportadores.

Após a exposição das células, o meio de cultura presente nos poços foi substituído por 200 µl de solução contendo 1 µM de rodamina B em meio de cultura para determinação das atividades da glicoproteína-P e MRP (*Multidrug*

Resistance-associates Protein - Proteína de resistência a múltiplas drogas). Após período de 30 min de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS para garantir a remoção de restos de corante. Em seguida, foram adicionados 250 µl de PBS em cada poço e a placa foi levada ao congelador a -76°C até o congelamento completo do conteúdo dos poços, para que ocorresse a ruptura das células.

Após descongelamento, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e 200 µl do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca preta. A intensidade de fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro (λ de excitação = 540 nm; λ de emissão = 580 nm). O valor obtido através da leitura reflete o acúmulo de rodamina nas células. Os procedimentos foram devidamente realizados evitando a exposição à luz para preservar a fluorescência (LIEBEL *et al.*, 2015).

7.6. PROLIFERAÇÃO CELULAR - CRISTAL VIOLETA

O cristal violeta ou violeta genciana (cloreto de pararosanilina) é um corante capaz de ser absorvido pelas células em cultura. Este corante básico cora o núcleo das células, de forma que a taxa de crescimento celular é refletida pela determinação colorimétrica das células coradas (GILLIES, DIDIER, DENTON, 1986; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

Após a exposição, o meio de cultura foi removido dos poços. Em seguida, os poços foram lavados uma vez com PBS a 37 °C para remoção dos resquícios de meio. Adicionou-se 50 µl de paraformaldeído em cada poço, e após isto, as células foram incubadas por 30 min em gelo. Após o término do tempo de incubação, o fixador foi substituído por 100 µl de solução de cristal violeta (0,25 mg.mL⁻¹ em H₂O) em cada poço e novamente as células foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente.

Após a incubação, a solução de cristal violeta foi removida, os poços foram lavados 2x com 150 µl de dH₂O. Em seguida, foram adicionados 100 µl de ácido acético 33% em cada poço e a placa permaneceu num agitador

durante 30 min e a temperatura ambiente. Após isso, foi realizada a leitura da absorbância em 570 nm.

O mesmo ensaio foi realizado com a sincronização prévia do ciclo celular. Para isso, as células foram plaqueadas sem SFB e assim permaneceram por um período de 16h (*overnight*) antes da realização da exposição aos contaminantes.

7.7. CICLO CELULAR

O Iodeto de Propídio (PI) é um corante fluorescente que cora DNA. O PI liga-se ao DNA e o conteúdo deste na célula pode ser determinado através da citometria de fluxo, revelando informações do ciclo celular: células nas fases G2 e M possuem o dobro de DNA em relação às em fase G0 e G1. Células na fase S têm quantidade de DNA entre estes dois extremos.

Após a exposição, as células foram tripsinizadas, contadas e aliquoteadas em microtubos na razão de 1×10^6 células/tubo. Após isso, a suspensão de células foi centrifugada a $280 \times g$ por 5 min (temperatura 4°C). O *pellet* foi lavado 1x em PBS, e as células foram fixadas em etanol a 70% para estocagem a -20 °C até a análise.

Para análise, as alíquotas de células foram centrifugadas, lavadas com PBS, novamente centrifugadas e ressuspensas em 0,5 ml da solução "*PI/RNase Staining Buffer*" da BD Pharmingen™, que contém Iodeto de Propídio e RNase. Após 15 min de incubação protegida da luz e a 4 °C, procedeu-se a aquisição dos dados em citômetro de fluxo *FACSCalibur* (Becton & Dickinson) (BD BIOSCIENCES, 2011). Os dados obtidos na citometria de fluxo foram analisados no programa *Flowing* (<http://www.flowingsoftware.com>).

O ensaio de ciclo celular foi realizado sem e com a sincronização prévia do ciclo celular. No caso da sincronização, as células foram plaqueadas sem SFB e assim permaneceram por um período de 16 h (*overnight*) antes da realização da exposição aos contaminantes. Já no caso de não sincronização, não houve privação de SBF.

7.8. ENSAIO DO *SCRATCH*

O ensaio do *scratch* é um dos métodos mais simples e econômicos para analisar a migração celular *in vitro*. Este método baseia-se em criar um espaço livre de células em uma monocamada de células, para o qual as células se movimentarão a fim de fechar essa abertura, restabelecendo contato célula-célula.

Para isso, as células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e expostas as nanopartículas. Em seguida, após a remoção do meio de cultura, foi feito um “risco” linear na monocamada de células com uma ponteira de pipeta “P10”. Depois destes passos, os poços foram lavados com PBS para remoção dos restos celulares que foram soltos e foi restituído o meio de cultura à placa (com a ausência de SFB, a fim de minimizar a interferência na análise pela proliferação celular). Imagens foram capturadas em microscópio invertido nos tempos “0” e “48 h” (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

A análise das imagens capturadas foi realizada através da medição do tamanho da abertura criada com o auxílio do *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) ao longo do tempo.

7.9. NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Para detectar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizado o marcador fluorescente diclorofluoresceína diacetato (H2DCFDA), que difunde-se passivamente nas células, é desacetilado (DCFH2) e oxidado, originando 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente (HAUGLAND, 1996 apud LIEBEL *et al.*, 2011). Embora este método quantifique principalmente o peróxido de hidrogênio, ele não é totalmente específico para esta espécie reativa de oxigênio, e outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também podem converter H2DCFDA para H2DCF fluorescente (KALYANARAMAN *et al.*, 2012).

Após término do período de exposição, o meio de cultura dos poços foi removido e 200 µl de meio contendo H2DCFDA (10 mM preparado em DMSO;

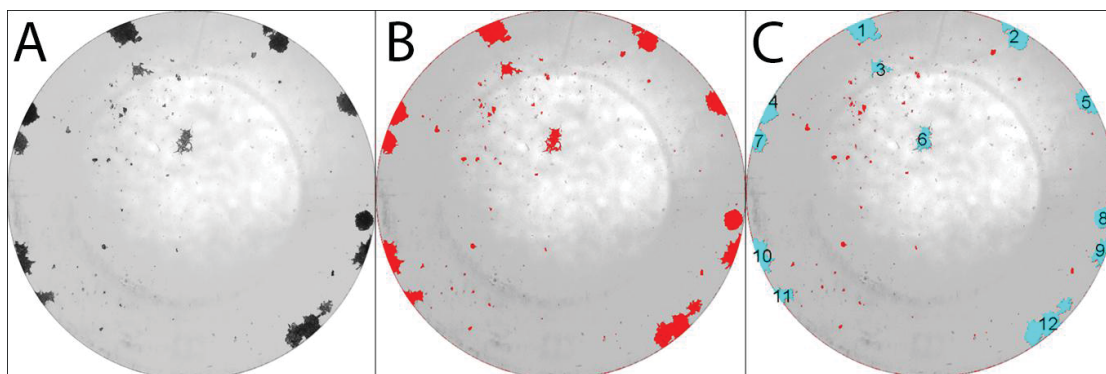
concentração final do DMSO = 0,1%) foi adicionado a cada micropoço. Passados 15 min de incubação a 37 °C, as células foram lavadas duas vezes em PBS, e foram adicionados 250 µl de PBS para a leitura em espectrofluorímetro (λ de excitação = 488 nm; λ de emissão = 530 nm). Durante o processamento, o experimento foi protegido da luz para evitar perda de fluorescência.

7.10. ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico é um ensaio de sobrevivência celular baseado na capacidade de uma única célula crescer e formar colônia. A colônia é definida como constituída por pelo menos 50 células. O ensaio essencialmente testa a capacidade da célula de sofrer divisão ilimitada (FRANKEN *et al.*, 2006).

Para isso, foram plaqueadas 250 células por poço numa placa de 24 poços, em meio DMEM suplemento com SFB a 10%. No dia seguinte, realizou-se a exposição aos contaminantes por um período de 24 h. Finalizada a exposição, o meio contendo os contaminantes foi cuidadosamente removido, descartado e substituído por novo meio DMEM + 10% de SFB, em que as células permaneceram por 7 dias. Em seguida, as células foram fixadas, adicionando-se 400 µl de paraformaldeído 4% em cada poço, onde repousaram durante 30 min em temperatura ambiente. O fixador foi substituído pela solução de cristal violeta (0,25 mg.ml⁻¹ em H₂O) e após 15 min a temperatura ambiente, os poços foram lavados 2-3x com PBS. Todo este processamento foi realizado com muito cuidado, a fim de preservar as colônias. A placa foi levada ao microscópio invertido para contagem de colônias. Também foram capturadas imagens do fundo dos poços contendo as colônias devidamente fixadas com câmera *Canon PowerShot Sx40HS* com lente em macro contra um fundo branco sob fonte de luz branca. Estas imagens foram analisadas no software *ImageJ* para contagem das colônias e determinação da área das mesmas (FIGURA 8).

FIGURA 8



FONTE: O Autor (2016). Processo de análise das imagens para ensaio clonogênico. (a) foto em escala de cinza do fundo do poço de placa de 24 poços, após fixação e coloração das colônias. (b) seleção realizada através da seleção do valor de "threshold" adequado no *software ImageJ*. (c) detecção e contagem das colônias através do comando "*analyze particles*". Colônias consideradas a partir de 600 pixels.

7.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados foram analisados através da Análise de Variância de uma Via (one-way ANOVA), seguidos pelo teste de Dunnett's (para comparação dos grupos expostos *versus* controle) quando apresentaram distribuição normal. Caso contrário, testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns) foram empregados. Os seguintes grupos foram comparados: controle vs grupos expostos a AgNPs (0,01-100 ng.mL⁻¹); controle vs grupos expostos ao AuNPs (0,01-100 ng.mL⁻¹).

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

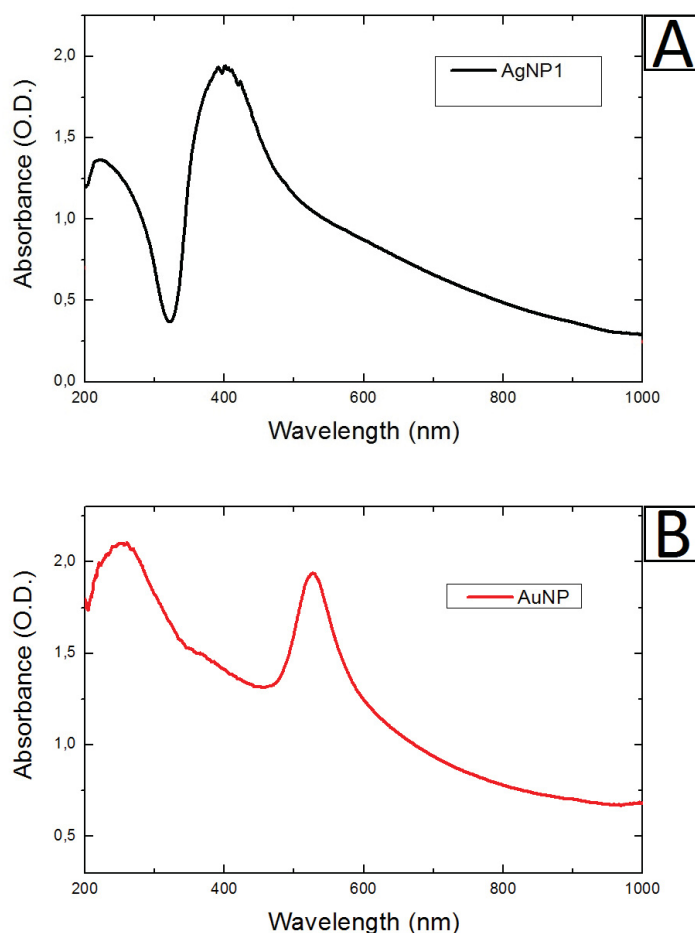
8.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

8.1.1. UV-vis

As suspensões de nanopartículas de prata foram submetidas, logo após sua síntese, à leitura no equipamento UV-VIS e apresentaram picos de absorção em 400 nm (AgNPs) e 519 nm (AuNPs; FIGURA 9), responsáveis pela coloração das soluções coloidais. Estes valores são esperados para

AgNPs e AuNPs. O fato de apresentarem um pico de absorção indica que as partículas apresentam formato aproximadamente esférico.

FIGURA 9

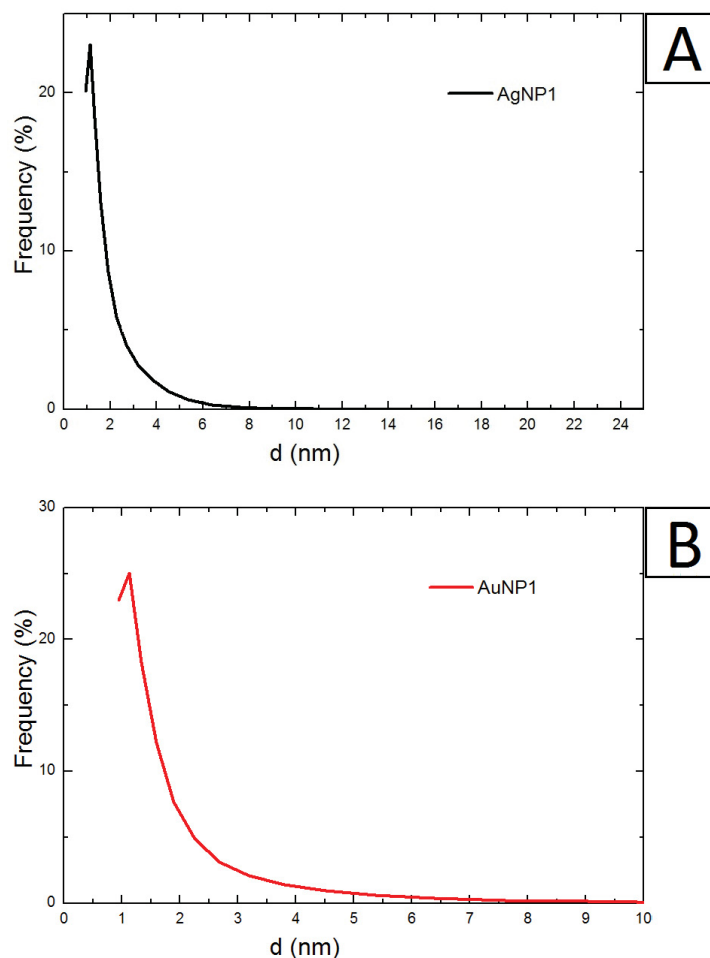


FONTE: O Autor (2016). Espectro de absorção UV/VIS da amostra de AgNPs (a) e AuNPs (b) em água. Eixo “Y” representa o número de partículas, e eixo “X” o comprimento de onda.

8.1.2 Espalhamento dinâmico de luz - DLS

As amostras de NPs apresentaram uma estreita distribuição de tamanho, com maior prevalência entre 1 e 2 nm, chegando até a 4 nm (FIGURA 10). Estudos relatam que a toxicidade de nanopartículas é tamanho-dependente, sendo que quanto menor a nanopartícula, maior a sua toxicidade (PAN *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2014). Assim, o tamanho das NPs produzidas foi ideal para o objetivo deste estudo.

FIGURA 10



FONTE: O Autor (2016). DLS de uma amostra de AgNPs (a) e AuNPs (b). Partículas com tamanho entre 1 e 2 nm.

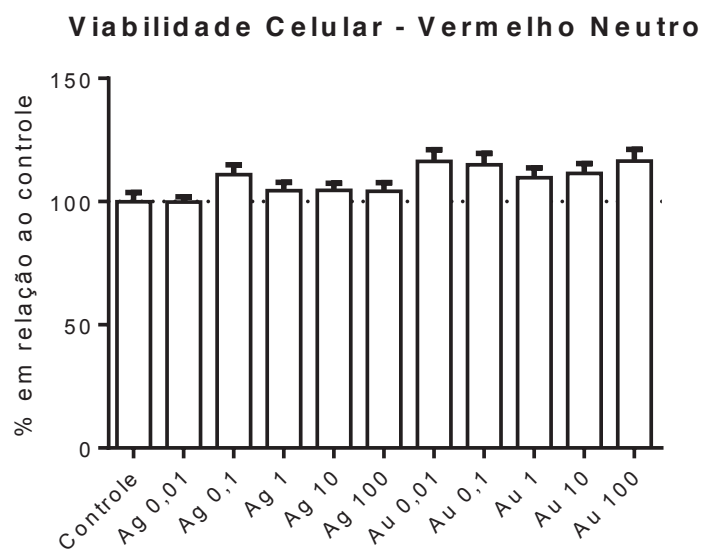
8.2. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

No ensaio de viabilidade celular através do vermelho neutro, nenhum dos grupos apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle (FIGURA 11). O fato da viabilidade destas células aparentemente não ser comprometida, não descarta de forma definitiva a possibilidade de efeito tóxico. Deve considerar a presença de NPs no lisossomo, e a possibilidade destas mascararem de alguma forma a análise do vermelho neutro.

Sendo assim, optou-se por também empregar, no presente trabalho, o ensaio de azul de tripan como uma metodologia complementar na avaliação da

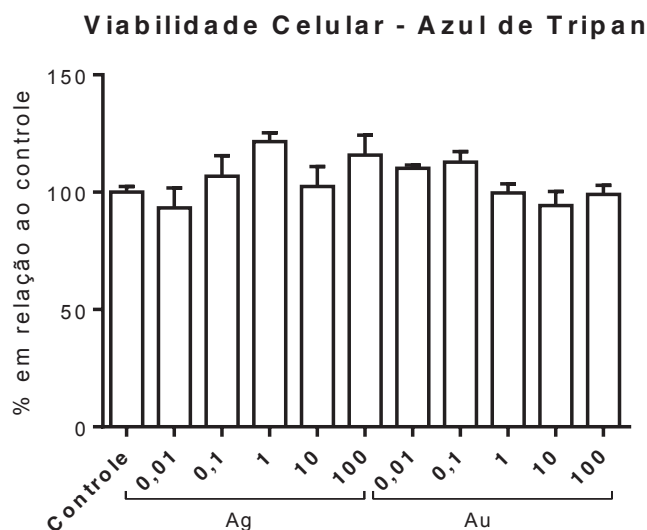
viabilidade celular. Contudo, o mesmo padrão de resposta celular foi observado neste segundo método, pelo fato de nenhum dos dez grupos expostos apresentarem diferença significativa em relação ao grupo controle (FIGURA 12).

FIGURA 11



FONTE: O Autor (2016). Viabilidade celular após 24 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNPs e AuNPs. Média \pm erro padrão. Nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle.

FIGURA 12



FONTE: O Autor (2016). Porcentagem de células viáveis após 24 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNPs e AuNPs. Média \pm erro padrão. Nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle.

Ambas abordagens metodológicas geraram resultados semelhantes, revelando estarem condizentes na avaliação da viabilidade celular envolvendo NPs de Au e Ag. Isso afasta a possibilidade das NPs estarem de alguma forma interferindo em algum dos ensaios e juntos asseguram a confiabilidade no resultado.

Lucas *et al.* (2015) detectaram agregados de AuNPs nos endossomos e lisossomos de células A431 (carcinoma epidermóide humano). Estas NPs tinham aproximadamente 34 nm de diâmetro e as células foram incubadas por apenas 30 min. Seus achados mostram que este curto intervalo de tempo é suficiente para internalização de AuNPs muito maiores do que as empregadas neste trabalho, descartando a possibilidade de que a ausência de efeito na viabilidade deva-se a não internalização das AuNPs pelas células.

Vijayakumar e Ganesan (2012) em seus estudos com AuNPs (20 nm de diâmetro, nas concentrações de 20, 50, 80, 110, and 140 µg/ml) também observaram a preservação da viabilidade das células CHO22 mesmo após 24 h de exposição, em diferentes análises de citotoxicidade (vermelho neutro, MTT e liberação da enzima lactato desidrogenase). Todas as concentrações utilizadas foram maiores que as aqui testadas. A relação destes resultados revelam a

capacidade das AuNPs não afetarem a viabilidade celular em uma ampla faixa de concentrações e diferentes ensaios.

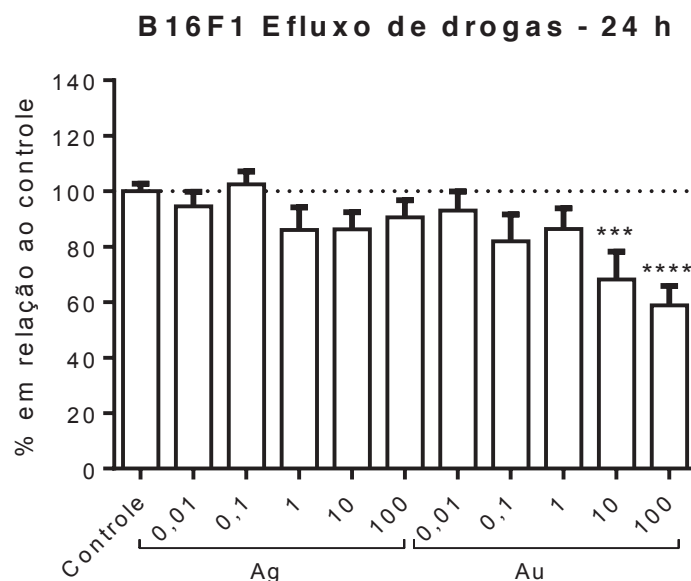
Ao contrário dos resultados aqui apresentados, Grosse, Evje e Syversen (2013) observaram redução na incorporação do vermelho neutro em células endoteliais de cérebro de rato (RBE4), expostas por 24 h a AgNPs (<10 nm). Contudo, as concentrações utilizadas foram de 1, 10 e 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, muito maiores do que as deste estudo. Além disso, eles notaram que diferentes tempos de exposição, tamanhos e concentrações de AgNPs provocaram respostas celulares distintas, através desta análise.

De modo semelhante, Chairuangkitti *et al.* (2013) verificaram que células A549 (linhagem de carcinoma pulmonar humano) após exposição a AgNPs sofreram redução na viabilidade celular. Porém, este resultado foi associado ao aumento na produção de EROs, que por sua vez corresponde ao observado no presente trabalho (FIGURA 18).

8.3. ATIVIDADE DE TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS

Dois grupos contendo as maiores concentrações de AuNPs (10 ng/ml e 100 ng/ml) apresentaram uma redução (32% e 41%) na atividade dos transportadores do sistema MDR. Quanto às AgNPs, nenhuma das concentrações empregadas revelaram diferença estatística significativa em relação ao controle (FIGURA 13).

FIGURA 13



FONTE: O Autor (2016). Atividade dos transportadores de efluxo de drogas após 24 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNPs e AuNPs. O gráfico reflete o efluxo de drogas, uma vez que os valores obtidos referentes ao acúmulo da rodamina foram invertidos para construção do gráfico. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Muito têm se investigado a cerca das nanopartículas em relação ao sistema MDR. Trabalhos que investigaram a conjugação de quimioterápicos às AuNPs, a fim de otimizar a captação destas drogas, em linhagens MDR - resistentes à multidrogas, como a linhagem de células MCF-7/ADR, de câncer de mama (WANG *et al.*, 2011) e linhagem de hepatocarcinoma HepG2R (GU *et al.*, 2012), apresentaram resultados promissores. Os quimioterápicos associados às nanopartículas atingiram concentrações intracelulares mais elevadas em relação à administração da droga livre (DREADEN *et al.*, 2012).

Quanto às AgNPs, tradicionalmente têm sido reconhecidas pelo seu potencial microbicida (SWATHY *et al.*, 2014; VAN PHU *et al.*, 2014). Porém, estas nanopartículas também têm se mostrado eficientes no combate a bactérias resistentes a antibióticos. Não somente elas têm atividade microbicida intrínseca, como também atuam de forma sinérgica quando conjugadas a antibióticos, sendo capazes de subverter o sistema MDR, sendo mais eficazes do que o antibiótico ou a própria nanopartícula separados (BROWN *et al.*, 2012). Brown *et al.* (2012) investigaram a ação de AgNPs e

AuNPs. AuNPs não apresentaram propriedades microbidas intrínsecas como as AgNPs, porém, quando funcionalizadas com ampicilina, ambas NPs apresentaram amplo espectro de ação, contra bactérias gram-negativas e gram-positivas.

Com base nesses resultados, a hipótese inicial de que a exposição poderia aumentar a malignidade das células, neste caso, aumentando a atividade dos transportadores de efluxo de drogas (processo que interferiria de maneira negativa no prognóstico e tratamento de um paciente diagnosticado com melanoma), é refutada. Isto porque as AuNPs reduziram a atividade destes transportadores, esses dados corroboram com a possibilidade do emprego dessas NPs como possíveis adjuvantes no tratamento quimioterápico (JAIN; HIRST; O'SULLIVAN, 2012).

Os transportadores de efluxo de drogas estão presentes nas barreiras hemato-encefálica, hemato-testicular e hemato-placentária, fazendo a proteção do sistema nervoso central (SNC), células germinativas dos testículos e feto, respectivamente. O funcionamento destes transportadores é de suma importância para a eliminação de possíveis toxinas, drogas, metabólitos e xenobióticos circulantes, para preservação da integridade do sistema em questão (LÖSCHER, POTSCHKA, 2005; MRUK, SU, CHENG, 2011; NI, MAO, 2011).

A redução da atividade dos transportadores de efluxo, a partir dessa ótica, pode ser drástica. O SNC, testículos e feto tornar-se-iam mais suscetíveis e expostos às diversas substâncias nocivas, das quais outrora estariam naturalmente protegidos. Possíveis prejuízos neurológicos, reprodutivos e teratológicos ocorreriam. Estes resultados chamam a atenção para possíveis efeitos colaterais ocasionados por terapias envolvendo essas NPs, e a necessidade de investigá-los.

8.4. PROLIFERAÇÃO CELULAR - CRISTAL VIOLETA

Segundo a abordagem através do Cristal violeta, as concentrações de 1 ng.ml^{-1} de AgNPs e 1 ng.ml^{-1} de AuNPs causaram aumento da proliferação celular de aproximadamente 19% e 18%, respectivamente, em relação ao

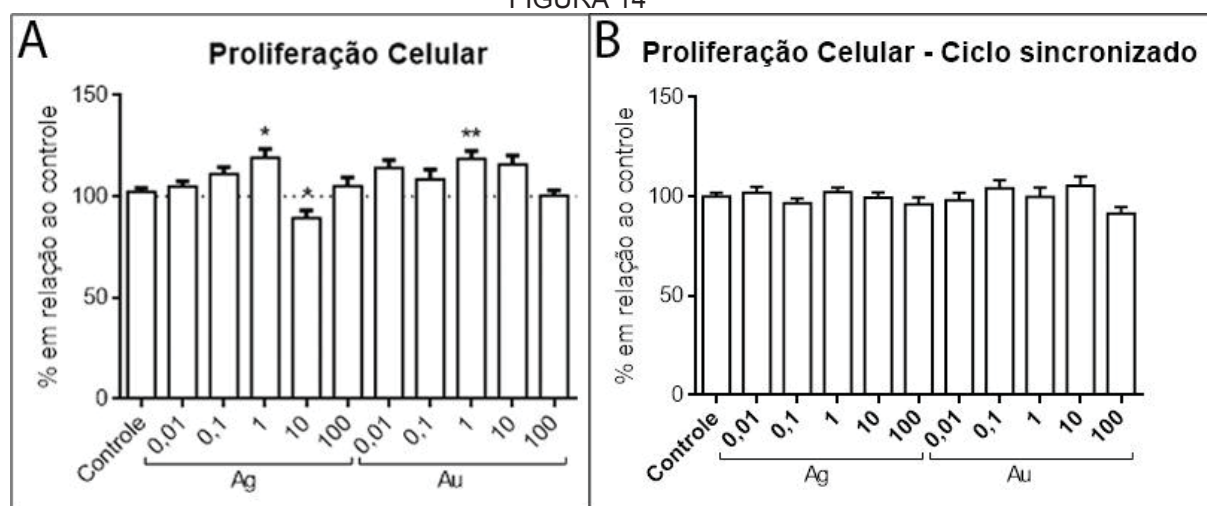
controle. Por outro lado, a concentração de 10 ng.ml⁻¹ de AgNPs apresentou uma redução de 11% neste parâmetro. Estes efeitos deixaram de ocorrer quando o ensaio foi repetido, com realização da sincronização do ciclo celular, sendo que desta vez, nenhum grupo se apresentou estatisticamente diferente do grupo controle (FIGURA 14), bem como nos ensaios de viabilidade celular, mais uma vez refutando a hipótese de aumento das características malignas das células.

É importante a sincronização do ciclo para garantir que toda a amostra de células responda a exposição partindo do mesmo ponto. A suscetividade das células aos efeitos deve variar conforme a etapa do ciclo em que se encontram, o que poderia explicar o porquê de resultados diferentes dos ensaios, com e sem a sincronização.

Também há a possibilidade das células sofrerem um dano pela exposição após terem passado por um ponto de checagem, enquanto que, se estivessem mais atrasadas no ciclo, no momento da exposição, ficariam retidas e não conseguiriam ultrapassar este ponto, mesmo havendo o mesmo dano.

Para colaborar com o entendimento do processo de proliferação celular, foi realizado também o ensaio de ciclo celular. A relação dos resultados de ambos ensaios encontram-se melhor discutidas no tópico a seguir (8.5).

FIGURA 14



FONTE: O Autor (2016). Proliferação celular após 24 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNPs e AuNPs. (A) Ciclo celular não sincronizado. (B) Ciclo celular sincronizado. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *p<0,05; **p<0,01.

Asharani, Hande e Valiyaveetil (2009) em experimentos expondo fibroblastos humanos (IMR-90) e células de glioblastoma humano (U251) às AgNPs observaram a inibição da proliferação celular (os autores não informaram se houve sincronização do ciclo celular), além de anormalidades cromossômicas.

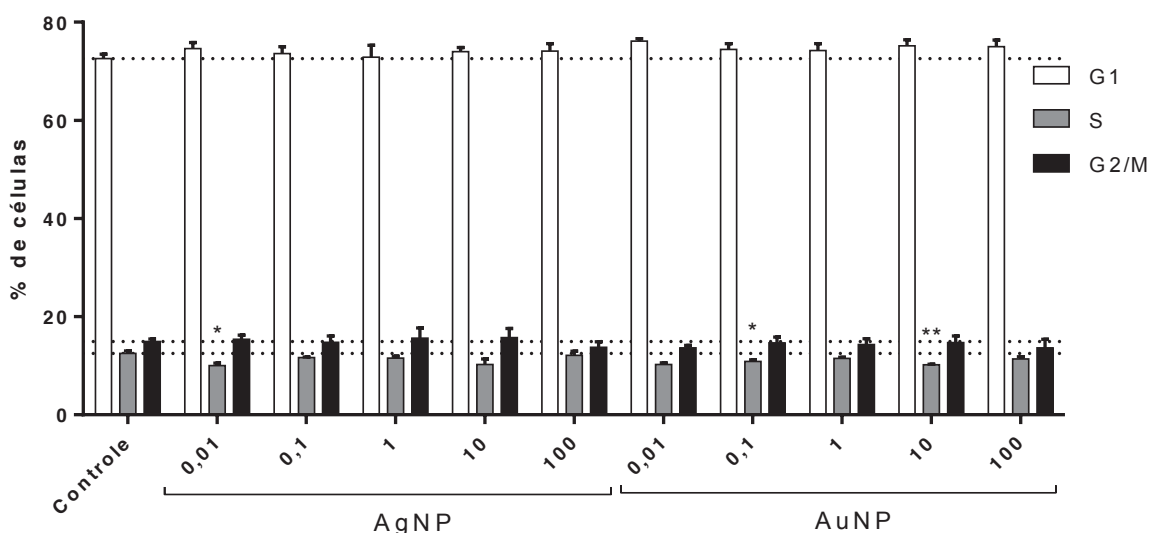
Ao contrário dos resultados observados no presente estudo, achados de Liu *et al.* (2014) em células A549 e 95D (linhagens de carcinoma pulmonar humano), AuNPs de 5 nm inibiram a proliferação celular (os autores não informaram se houve sincronização do ciclo celular), mas aumentaram a invasão, apoptose e levaram a retenção de células na fase G0/G1 do ciclo celular. Estes efeitos foram dependentes do tamanho da partícula, pois não foram observados quando AuNPs de maiores diâmetros (20 e 40 nm) foram utilizadas.

8.5. CICLO CELULAR

Houve uma diminuição de aproximadamente 2% do número de células na fase S em relação ao grupo controle nos grupos AgNPs 0,01; AuNPs 0,1 e AuNPs 10. Quanto às outras fases para os demais grupos, não houve diferença estatística.

FIGURA 15

Ciclo Celular



FONTE: O Autor (2016). Porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular após 24 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNPs e AuNPs. Média \pm erro padrão.

Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Foram preparadas amostras para realização do ensaio de ciclo celular com a sincronização do ciclo celular antecedendo a exposição, como realizado para o ensaio de proliferação celular, porém não foi possível a aquisição dos dados devido à quebra do citômetro de fluxo do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. As amostras estão armazenadas, para futura análise após conserto do equipamento.

A ausência de alteração na população de células em G2 - fase marcada pela intensa preparação da célula para realização do evento mitótico - em relação ao controle condiz com os resultados do ensaio de proliferação celular com cristal violeta, através do qual não foi detectada diferença na proliferação das células.

Em células de câncer de próstata humanas (DU-145) foi mostrado que a exposição a AuNPs (~10 nm; 15 nM) reteve as células em G2/M (ROA *et al.*, 2009), ao passo que diminuiu a expressão de p53 e ciclina A e aumentou a expressão de ciclina B1 e ciclina E. Essas AuNPs desencadearam a ativação das quinases CDK levando à aceleração do ciclo celular na fase G0/G1 e retenção na fase G2/M. Esses achados diferem dos resultados encontrados no presente trabalho. Várias podem ser as causas, como a diferença na concentração, tamanho e método de síntese das NPs, bem como a linhagem celular diferente.

A redução do percentual de células na fase S observada no presente trabalho, embora mínima, corrobora com estudos com células malignas, que possuem alterações no funcionamento dos mecanismos de controle do ciclo celular, e que empregam AuNPs com a proposta de regular o ciclo celular (impedindo que células inaptas passem pra fase S), e assim sensibilizar as células cancerosas aos tratamentos (MACKEY; EL-SAYED, 2014; ROA *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2012). Embora o efeito de redução de células em fase S contrarie nossa hipótese inicial, ela colabora para o desenvolvimento de mais adjuvantes na terapia contra o câncer.

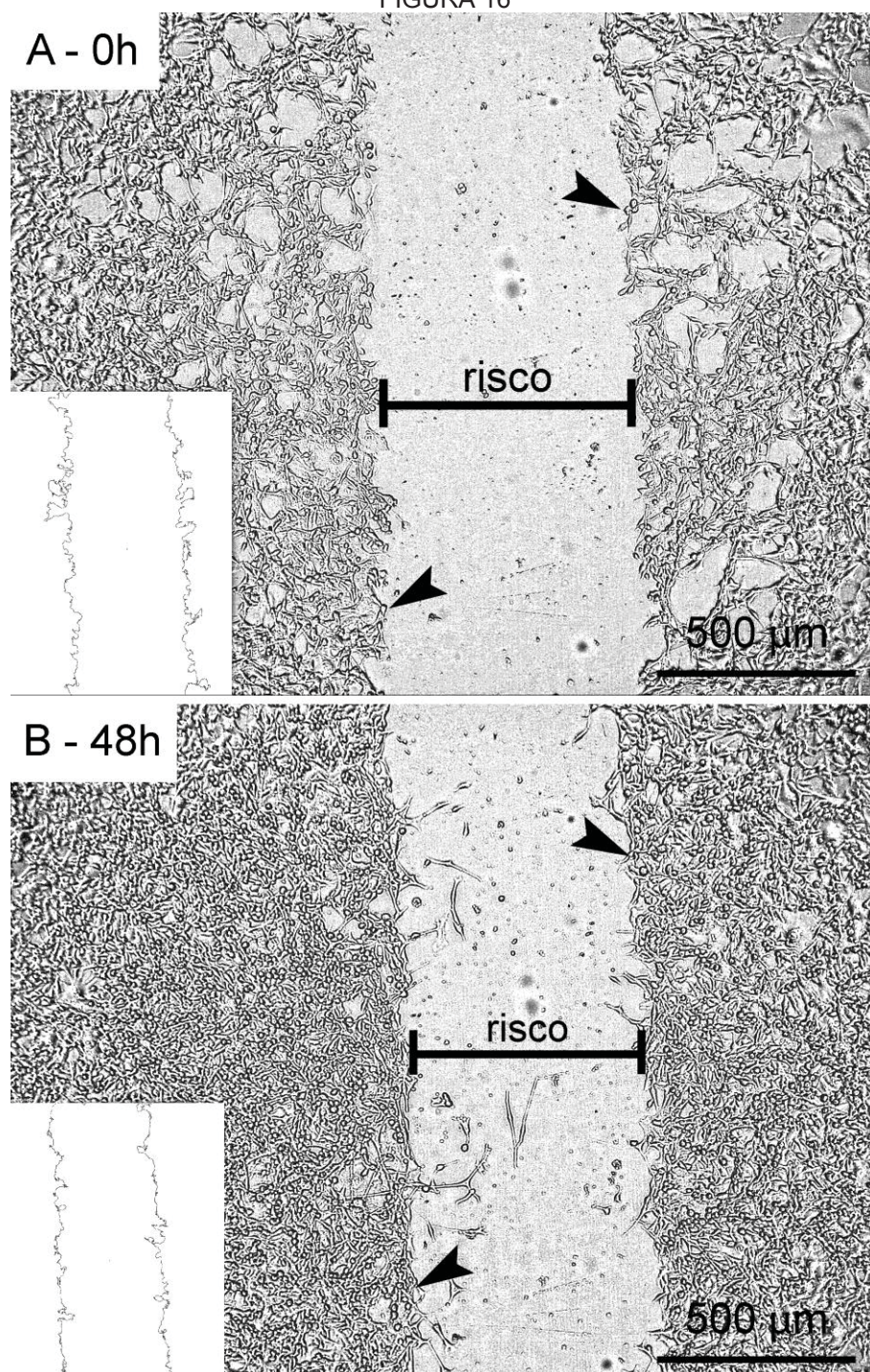
O estresse oxidativo é capaz de gerar lesões no DNA, de modo que a progressão no ciclo celular pode ser impedida pelos pontos de checagem (BERRA, MENCK; DI MASCIO, 2006). No presente trabalho foi notado aumento da produção de EROs, indicando um possível quadro de estresse oxidativo (ver tópico 8.7), bem como redução do número de células na fase S do ciclo celular.

Relacionando estes dois resultados, presume-se que um possível estresse oxidativo possa levar estas células a terem sua progressão no ciclo celular bloqueada no ponto de checagem G1/S, explicando a queda do número de células em S. São necessárias análises mais específicas para investigar este processo.

8.6. ENSAIO *SCRATCH*

No ensaio *scratch*, foram capturadas imagens da área total do risco no momento da realização do mesmo (ao final da exposição), e depois de 48 h da realização do mesmo (FIGURA 16).

FIGURA 16



FONTE: O Autor (2016). Imagens de uma das amostras do grupo controle. Em "A" observa-se a área dos riscos logo após a realização do mesmo, e em "B" 48 h depois. As setas indicam as células da borda do risco. Quadros nos cantos inferiores esquerdos representam o risco reconhecido pelo software *ImageJ*.

Foi calculada a diferença da área total do risco entre estes dois momentos e comparada ao grupo controle, mas nenhum dos grupos

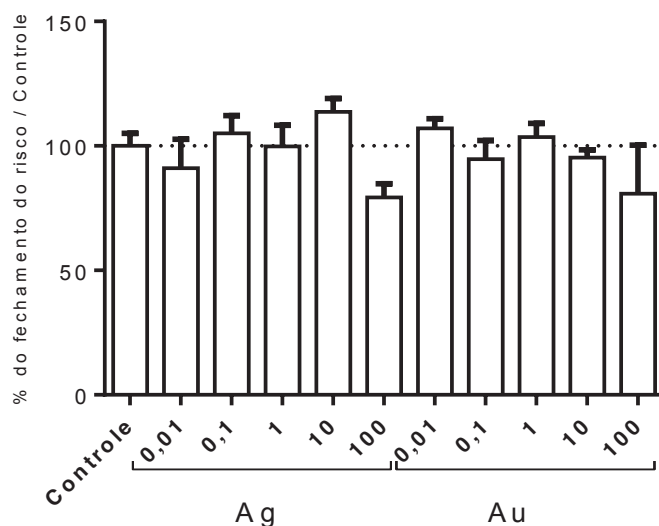
apresentou diferença estatística com relação ao controle (FIGURA 17). O aumento da capacidade de migração celular é mais um indicativo de malignidade tumoral esperado, porém não observado após a exposição das presentes NPs.

As imagens mostram não apenas a migração, mas também a proliferação celular. Embora as células tenham ficado sob privação de SFB nas 48 h posteriores ao risco, é possível visualizar na própria imagem uma maior densidade de células em 48 h em relação à 0h. Contudo, essa densidade maior de células não foi suficiente para acusar diferença estatística na área do risco, condizendo com o resultado obtido no ensaio de proliferação celular com cristal violeta.

Alguns pesquisadores optam por empregar neste ensaio um inibidor de proliferação como a mitomicina-C, por exemplo, mas é descrito na literatura que esta droga inibe a síntese proteica (SNODGRASS *et al.*, 2010) entre outros efeitos citotóxicos que devem ser considerados como uma variável a mais no momento de realizar ensaios desta natureza.

FIGURA 17

Ensaio Scratch



FONTE: O Autor (2016). Porcentagem do fechamento do risco em relação ao controle. Média ± erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001.

Kalishwaralal *et al.* (2009) mostraram que AgNPs (500 nM) em 24 h de exposição impediram a migração (ensaio *scratch*), bem como a proliferação em células endoteliais de retina bovina, bloqueando a ação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), revelando potencial efeito anti-angiogênico de AgNPs. Neste mesmo estudo foi reportado que AgNPs inibiram a sobrevivência celular via PI3K/Akt (KALISHWARALAL *et al.*, 2009). Efeito anti-angiogênico semelhante também foi reportado com AuNPs em células endoteliais de veia umbilical humana, que apresentaram diminuição da proliferação celular acompanhada da redução dos níveis VEGF (PAN *et al.*, 2014).

As células tumorais induzem a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) a partir da vascularização preexistente, imitando o mecanismo de neovascularização utilizados pelas células normais para promover a angiogênese fisiológica. Este aumento de suprimento sanguíneo, induzido pelo tumor, supre suas necessidades metabólicas, trazendo nutrientes e levando catabólitos. Isto proporciona às células tumorais a capacidade de sobreviver e propagar-se num ambiente hostil, favorecendo a capacidade metastática do tumor (PAPETTI; HERMAN, 2002).

Embora angiogênese não tenha sido abordada no presente trabalho, essas informações são de extrema importância, considerando o papel da angiogênese no desenvolvimento tumoral (LUPO *et al.*, 2016) e a ação das NPs de Au e Ag neste contexto.

Neibert *et al.* (2012) mostraram que AgNPs foram capazes de aumentar a proliferação e migração de fibroblastos murinos (NIH/3T3) no ensaio *scratch*, e sugeriram até que estas NPs poderiam acelerar o processo de fechamento e cura de feridas. Em contrapartida, se estes efeitos forem transponíveis para células tumorais, o aumento da proliferação e migração seriam fatores de promoção da malignidade tumoral.

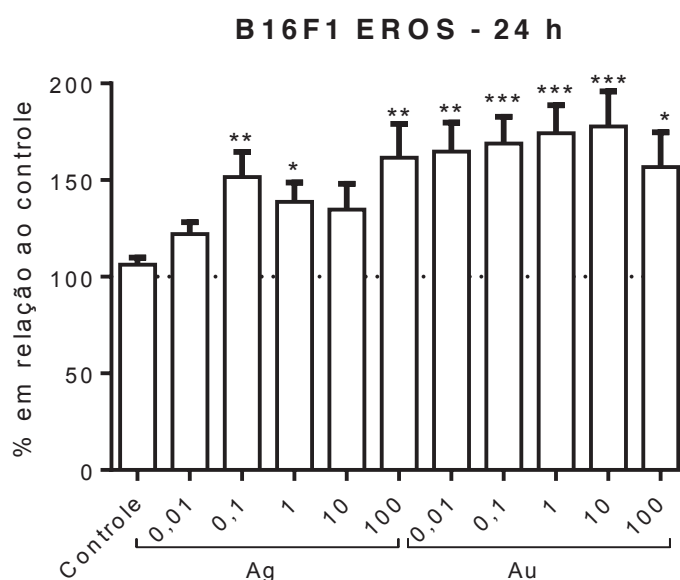
AuNPs também foram relacionadas com aumento da migração celular em células A549 e 95D (carcinoma pulmonar), porém pelo aumento da expressão de MMP9 e ICAM-1 (proteínas importantes no processo de invasão e migração, respectivamente) após tratamento com NP de 5 e 10 nm, o que potencialmente eleva a capacidade metastática das células em questão. Em contraste, estas proteínas tiveram sua expressão diminuída pela exposição a

AuNPs de 40 nm, mais uma vez mostrando a importância do tamanho das partículas para diferentes efeitos (LIU *et al.*, 2014).

8.7. NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

No presente trabalho, foi observado aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio na maioria dos grupos experimentais. As concentrações de 0,1; 1 e 100 ng.ml⁻¹ de AgNPs apresentaram aumento de aproximadamente 51%, 38% e 61%, respectivamente, na produção de EROs. Todas as cinco concentrações diferentes de AuNPs também apresentaram esse tipo de resposta, variando de 56% a 77% (FIGURA 18).

FIGURA 18



FONTE: O Autor (2016). Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio após 24 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNPs e AuNPs. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001.

O aumento da produção dessas espécies está relacionada ao estresse oxidativo, quadro que pode causar danos irreversíveis na estrutura e função da célula. A observação deste efeito pode revelar indícios de toxicidade decorrentes da exposição.

Do mesmo modo como encontrado nestes resultados, o aumento da produção de EROs foi observado por Chairuangkitti *et al.* (2013), que investigaram o efeito de AgNPs em células A549. Contudo, ao realizarem um pré-tratamento com N-acetilcisteína (precursor da síntese de glutathione e antioxidante), não houve aumento de EROs. Mesmo assim foi observado efeito tóxico quando analisado o ciclo celular, e através disso, os autores propuseram que os efeitos tóxicos *in vitro* das AgNPs sobre as células A549 podem se dar através de duas vias: EROs-dependente (citotoxicidade) e EROs-independentes (interrupção do ciclo celular; CHAIRUANGKITTI *et al.*, 2013).

Efeito semelhante, decorrente a exposição a AgNPs foi verificado nos estudos de Gurunathan *et al.* (2014), que utilizaram AgNPs e AuNPs em células de câncer de mama MDA-MB-231, e através dessa mesma abordagem, foi observado que as AgNPs aumentaram os níveis de espécies reativas de oxigênio, porém as AuNPs não apresentaram efeito.

Contudo, a exposição às AuNPs também teve a sua vez na associação com as EROs. No trabalho de Li *et al.* (2010) foi visto que AuNPs (20 nm de diâmetro) em células MRC-5 (fibroblastos de pulmão humano) induziram estresse oxidativo juntamente a autofagia. Além disso, também foi encontrado indícios de peroxidação lipídica, aumento da produção de antioxidantes e aumento da expressão de genes de resposta ao estresse (LI *et al.*, 2010).

Essa resposta também foi verificada modelos de estudo *in vivo*. Mexilhões (*Mytilus edulis*) expostos por 24 h a 0,75 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de AuNPs (~5 nm de diâmetro) sofreram estresse oxidativo, aumento da peroxidação lipídica e perda da estabilidade da membrana lisossomal (TEDESCO *et al.* 2010; TEDESCO *et al.* 2013).

Segundo a revisão de Liou e Storz (2010) sobre espécies reativas no câncer, EROs estão envolvidas com os processos de progressão do ciclo celular e proliferação, sobrevivência e apoptose, metabolismo energético, morfologia celular, adesão célula-célula, motilidade celular, angiogênese e manutenção de células tronco tumorais.

Há tempos já se sabe que EROs são mediadoras do processo de promoção e progressão tumoral e sua produção pode ser observada em várias linhagens tumorais diferentes - inclusive linhagens de melanoma humano SK-

Mel. (SZATROWSKI; NATHAN, 1991). Níveis elevados de EROs em linhagem de queratinócitos de rato aumentaram a capacidade proliferativa das células, tanto em modelos de estudo *in vitro* quanto *in vivo*, implicando na ativação de Erk-1/2 and p38 MAP quinase envolvidas com a progressão tumoral (GUPTA; ROSENBERGER; BOWDEN, 1999).

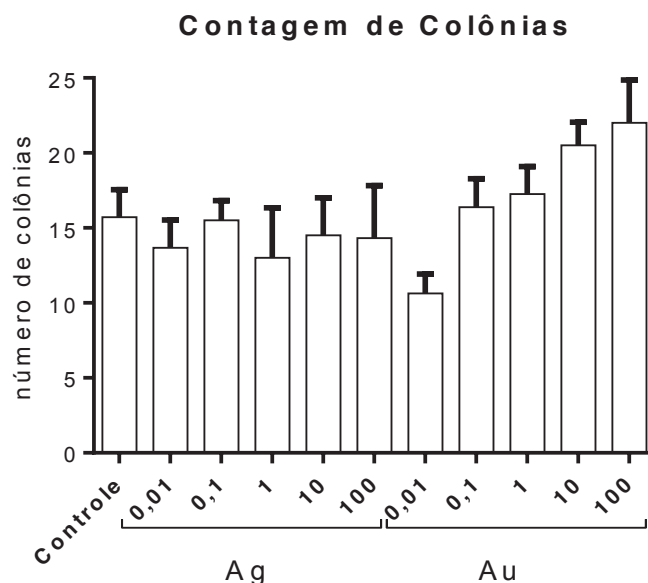
A capacidade de EROs afetarem mecanismos de sobrevivência celular - como proliferação, migração, além de causar danos ao DNA - lhes confere potencial carcinogênico. Entretanto, em diferentes contextos e aplicações, o fato das EROs induzirem a morte celular lhes caracteriza como agente anti-tumoral (STORZ, 2005).

No presente trabalho, embora exista o aumento expressivo da produção dessas EROs decorrente da exposição às NPs, não foram observadas alterações na migração, capacidade de formação de colônias, ou até mesmo na proliferação celular (quando sincronizado o ciclo) que pudessem se relacionar com essa resposta celular. Este panorama suscita algumas questões, que por hora ficam em aberto: o aumento das EROs seria uma resposta de estresse agudo frente a exposição, insuficiente para afetar os demais processos celulares, e passível de retornar ao equilíbrio? Estendendo o tempo diante desse estresse, as outras funções da célula apresentariam alguma resposta diferente?

8.8. ENSAIO CLONOGÊNICO

No ensaio clonogênico foi possível estimar o número de colônias, bem como a área das colônias. Quanto à contagem das colônias, nenhum dos grupos apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle, sendo que o número médio de colônias encontradas por poço nos grupos de AgNPs e AuNPs ficou entre 10,6 a 22 colônias e o controle em 15,7 (FIGURA 19).

FIGURA 19

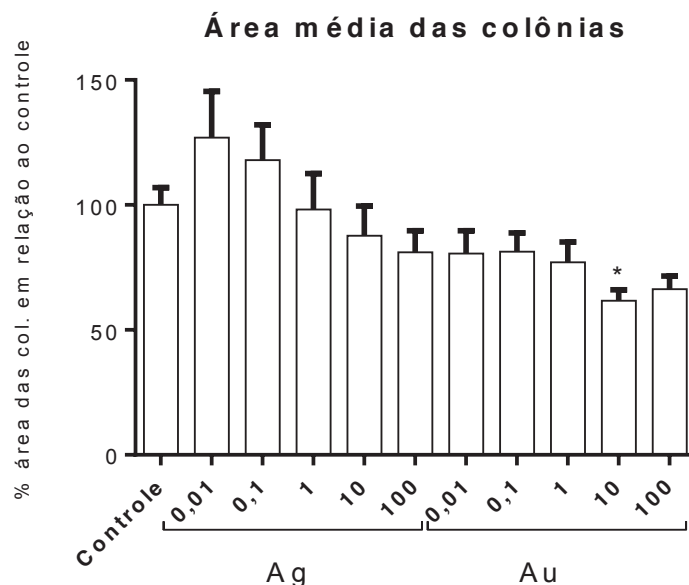


FONTE: O Autor (2016). Média do número de colônias formadas após 24 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNPs e AuNPs. Média \pm erro padrão. Nenhum grupo apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle.

Através destes resultados, observa-se que a exposição a essas AgNPs e AuNPs não interferiu na capacidade destas células sobreviverem e formarem colônias. Para investigar se a exposição poderia afetar a característica das colônias formadas, foi analisado o tamanho destas. As colônias contadas tiveram suas respectivas áreas analisadas. A área média de cada um dos grupos foi comparada à média do grupo controle. Apenas o grupo de AuNPs na concentração de 10 ng.ml^{-1} se apresentou estatisticamente diferente do grupo controle, revelando colônias menores, com uma média equivalentes a 61,6% da área das colônias observadas no grupo controle (FIGURA 20).

Estes resultados refutam a hipótese deste trabalho, uma vez que a capacidade de sobrevivência das células B16F1 em baixa densidade (revelada pelo número de colônias) não foi alterada pela exposição a estas NPs. Além disso, a capacidade proliferativa indicada através do tamanho das colônias foi reduzido com AuNPs a 10 ng.ml^{-1} , e nos outros grupos não foi afetada. Segundo a hipótese, esperava-se o aumento desses parâmetros.

FIGURA 20



FONTE: O Autor (2016). Média do número de colônias formadas após 24 h de exposição sob diferentes concentrações de AgNPs e AuNPs. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Swanner *et al.* (2015) viram através do ensaio clonogênico que AgNPs na concentração de $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ foram extremamente tóxicas para a linhagens de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231, BT-549, and SUM-159) inibindo 100% do seu potencial clonogênico.

Coulter *et al.* (2012) realizaram o ensaio clonogênico para determinar a citotoxicidade e o potencial de radiosensibilização de AuNPs em células de câncer de próstata (DU145), de mama (MDA-MB-231) e células normais imortalizadas (L132 - epitélio pulmonar). Células MDA-MB-231 tiveram a sobrevivência reduzida em 21%, enquanto as outras duas linhagens não tiveram seu potencial de formação de colônia afetado pelas AuNPs. Células MDAMB- 231 tratadas com $12 \mu\text{M}$ de AuNPs foram mais sensíveis ao raio-x, aumentando a eficácia terapêutica em 87%. Esta sensibilização à radiação não foi observada nas linhagens DU145 e L132. Concomitantemente, na investigação de produção de EROs (usando DCFDA) Coulter *et al.* (2012) verificaram o aumento dos níveis de espécies reativas nas células MDA-MB-231 e DU145. Embora os resultados da formação de colônia aqui apresentados não tenham sido tão expressivos como os de Coulter *et al.* (2012) (sem

diferença na número de colônias formadas, mas uma pequena redução no tamanho destas expostas a 10 ng/ml^{-1}), seus achados relativos a produção de EROs corroboram com os aqui apresentados (topico 8.7). Os resultados destes autores contrariam a hipótese desse trabalho, mostrando que essas NPs além de reduzirem a sobrevivência de células tumorais, ainda as tornam mais sensíveis ao tratamento.

8.9 RESUMO DOS RESULTADOS

Para um melhor entendimento, os resultados encontrados no presente estudo foram plotados na TABELA 1.

TABELA 1 – RESUMO DOS ENSAIOS SEGUIDOS DOS RESULTADOS OBTIDOS

Ensaio	AgNPs	AuNPs
Vermelho Neutro	=	=
Azul de Tripan	=	=
Ativ. Transportadores de efluxo	=	↓ 10 e 100 ng.ml^{-1}
Produção de EROs	↑ 0,1; 1 e 100 ng.ml^{-1}	↑ todas concentrações
Ciclo Celular	↓ fase S $0,01 \text{ ng.ml}^{-1}$	↓ fase S 0,1 e 10 ng.ml^{-1}
Cristal Violeta	↑ 1 ng.ml^{-1} ↓ 10 ng.ml^{-1}	↑ 1 ng.ml^{-1}
Cristal Violeta (Ciclo Sincronizado)	=	=
<i>Scratch</i>	=	=
Clonogênico (nº de colônias)	=	=
Clonogênico (tamanho das colônias)	=	↓ 10 ng.ml^{-1}

FONTE: O Autor (2017). O símbolo de igualdade (=) representa ensaio sem diferença significativa em relação ao grupo controle. Flechas para cima (↑) e baixo (↓) representam, respectivamente, aumento e diminuição do parâmetro no grupo indicado em relação ao grupo controle.

As NPs metálicas de Au e Ag, embora sejam diferentes em sua composição, apresentaram efeitos semelhantes em células B16F1 na maioria das análises, seja na ausência de efeitos, ou nas respostas diferenciadas. Mais estudos são necessários para afirmar a não toxicidade destas NPs, mas por

ora, os resultados aqui apresentados apontam na direção oposta à hipótese inicial de aumento da malignidade das células B16F1, conforme apresentado a seguir.

1) A viabilidade celular avaliada através de diferentes abordagens não foi alterada. Não foi verificada diminuição da viabilidade (o que revelaria toxicidade), tampouco o aumento deste parâmetro (o que apontaria para um possível aumento da resistência tumoral).

2) Ambas NPs não aumentaram a atividade dos transportadores de efluxo de drogas, o que tornaria as células tumorais B16F1 mais resistentes a quimioterápicos. Pelo contrário, AuNPs reduziram essa atividade, o que em prática poderia sensibilizar as células ao tratamento.

3) As diferenças iniciais observadas no ensaio de proliferação celular com cristal violeta não foram encontradas quando o ensaio foi repetido e submetido à sincronização do ciclo celular previamente à exposição.

4) As células B16F1 responderam à exposição a essas NPs metálicas com aumento da produção de EROs, acompanhado de pequena redução da população de células na fase S do ciclo celular (fase marcada pela duplicação do DNA e proteínas associadas). Caso estes efeitos estejam correlacionados, o estresse oxidativo poderia estar impedindo as células de entrar na fase S.

5) As demais fases do ciclo celular analisadas com iodeto de propídio não apresentaram diferença. Este padrão observado na fase G2 reforça o resultado do ensaio de proliferação.

6) A exposição às NPs não interferiu na migração de células B16F1 sob a perspectiva do ensaio de *scratch*.

7) A exposição não alterou a capacidade de formação de colônias nas células B16F1. Nenhum grupo apresentou diferença no número de colônias formadas. Entretanto, o grupo AuNPs 10 ng.ml^{-1} revelou colônias menores.

9. CONCLUSÕES

O campo da nanotecnologia é vasto e ainda tem muito a ser explorado no contexto biológico. Este trabalho visou investigar mais uma faceta disso: a contribuição das NPs de Au e Ag para a malignidade do melanoma.

Ao contrário do que se esperava, as nanopartículas de ouro e prata entre 1 e 4 nm não aumentaram características relacionadas a malignidade tumoral, como sobrevivência, proliferação e migração em células B16F1. Além disso, as NPs ainda foram capazes de reduzir a atividade de transportadores membrana envolvidos com a resistência à quimioterapia.

Embora os resultados obtidos não contribuam para corroborar a hipótese central deste estudo, eles direcionam para os diversos trabalhos da atualidade que buscam o emprego dessas NPs na biomedicina, seja em novas estratégias terapêuticas ou diagnósticas.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

As análises aqui apresentadas apenas apontam algumas direções e, conseqüentemente, levantam novas questões. Para melhor entendimento da ação destas NPs nas células B16F1, existem novos passos que podem ser dados:

- Realizar análises mais específicas relacionadas às EROs e estresse oxidativo. Determinação das espécies produzidas, avaliação da atividade do sistema antioxidante, investigação de peroxidação lipídica;
- Verificar se as respostas aqui apresentadas são modificadas ao longo do tempo, refazendo-as em diferentes tempos de exposição (12, 48, 72 ou 96 h);
- Analisar o efeito das NPs de Au e Ag no ciclo celular com a sincronização prévia do ciclo das células B16F1;

- Analisar a capacidade de invasão celular, através do ensaio de migração *transwell*, por exemplo;
- Identificar os transportadores de efluxo cuja exposição às NPs reduzem a atividade e buscar elucidar o mecanismo pelo qual as NPs interferem nesse sistema;
- Investigar a produção de melanina com ensaios de melanogênese.
- Investigar a exposição as NPs concomitantemente ao tratamento quimioterápico.

REFERÊNCIAS

- AMERICA CANCER SOCIETY - Risk Factors for Melanoma Skin. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>>. Acesso em: 28 jan. 2017.
- ARORA, S.; JAIN, J.; RAJWADE, J. M. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies. **Toxicology letters**, v. 179, n. 2, p. 93–100, 2008.
- ASHARANI, P. V., *et al.* Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 43–54, 2011.
- ASHARANI, P.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETIL, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BioMed Central Cell Biology**, v. 10, n. 65, 2009.
- ASTM Standard E 2456-06, 2012. Standard Terminology Relating to Nanotechnology **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2012, DOI: 10.1520/E2456-06R12. Disponível em <<http://www.astm.org/Standards/E2456.htm>> Acesso em: 13 mai. 2014.
- ATCC. **American Type Culture Collection**. 2014. Disponível em <<http://www.atcc.org/products/all/CRL-6475.aspx>> Acesso em: 13 mai. 2014.
- BD BIOSCIENCES TECHNICAL DATA SHEET. DNA staining protocol for flow cytometry. **BD Biosciences Technical Resources**, 2011. Disponível em <http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FlowCytometry_DNA_Staining_Protocol.pdf> Acesso em: 23 set. 2016.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. Dynamic Light Scattering: With applications to Chemistry, Biology and Physics. **Dover Publications**, 2000.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.
- BODELÓN, G. *et al.* Gold nanoparticles for regulation of cell function and behavior. **Nano Today**. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748013216303516>>. Acesso em 20 jan. 2017.
- BRAYDICH-STOLLE, L., *et al.* In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. **Toxicological sciences: an official Journal of the Society of Toxicology**, v. 88, n. 2, p. 412-419, 2005.
- BROWN, A. N. *et al.* Nanoparticles Functionalized with Ampicillin Destroy Multiple-Antibiotic-Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.8, p. 2768–2774, 2012.
- BRUNDLE, C. R.; EVANS, C. A.; WILSON, S. **Encyclopedia of materials characterization**. Butterworth-Heinemann, 1992.

CANCER WORLD - What do skin cancers types look like. Disponível em <<http://cancerworld.info/what-do-skin-cancers-types-look-like/>> Acesso em: 28 jan. 2017.

CHAIRUANGKITTI, P. *et al.* Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n.1, p. 330–338, 2013.

CHAMUNDEESWARI, M. *et al.* Preparation, characterization and evaluation of a biopolymeric gold nanocomposite with antimicrobial activity. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 55, n. 1, p.29-35, 2010.

CHO, W. S. *et al.* Acute toxicity and pharmacokinetics of 13nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 236, n. 1, p. 16–24, 2009.

COLMAN, B. P. *et al.* Emerging Contaminant or an Old Toxin in Disguise? Silver Nanoparticle Impacts on 39 Ecosystems. **Environmental science & technology**, v. 48, n.9, p. 5229–5236, 2014.

COULTER, J. A. *et al.* Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 2673–2685, 2012.

COUPS, E. J. *et al.* Skin self-examination behaviors among individuals diagnosed with melanoma. **Melanoma research**, v. 26, n. 1, p. 71-76, 2016.

DREADEN, E. C. *et al.* Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 3, n.4, p. 457–478, 2012.

EPA, 2007. Nanotechnology White Paper. US Environmental Protection Agency Report EPA 100/B-07/001, Washington. Disponível em: <<http://www.epa.gov/>>.

FARDEL, O.; KOLASA, E.; LE VEE, M. Environmental chemicals as substrates, inhibitors or inducers of drug transporters: implication for toxicokinetics, toxicity and pharmacokinetics. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 8, n. 1, p. 29-46, 2012.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, 1973.

FRANKEN, N.A. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

GALDIERO, S. *et al.* Silver Nanoparticles as Novel Antibacterial and Antiviral Agents. In: TORCHILIN, V. **Handbook of Nanobiomedical Research**. World Scientific, 2014. p. 565-594

GAO, Y. *et al.* Metallic nanoparticle production and consumption in China between 2000 and 2010 and associative aquatic environmental risk assessment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 6, p. 1681, 2013.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, cap.1, p.109–113, 1986.

GOODMAN, C. M. *et al.* Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. **Bioconjugate Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 897-900, 2004.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002.

GRANMAYEH RAD, A.; ABBASI, H.; AFZALI, M. H. Gold Nanoparticles: Synthesising, Characterizing and Reviewing Novel Application in Recent Years. **Physics Procedia**, v. 22, p. 203–208, 2011.

GROSSE S.; EVJE L.; SYVERSEN T. Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture. **Toxicology in Vitro**, v. 27, cap.1, p. 305–313, 2013.

GU, Y. J. *et al.* Gold-doxorubicin nanoconjugates for overcoming multidrug resistance. **Nanomedicine**. v. 8, n. 2, p. 204-11, 2012.

GUPTA, A.; ROSENBERGER, S. F.; BOWDEN, G. T. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 11, p. 2063-2073, 1999.

GURUNATHAN, S. *et al.* A green chemistry approach for synthesizing biocompatible gold nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 248, 2014.

HAGENS, W. I. *et al.* What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 49, n. 3, p. 217-229, 2007.

HAUGLAND, R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.1996. In: LIEBEL, S.; **Respostas Celulares de Hepatócitos de *Prochilodus lineatus* (Curimatá) após exposição à Cilindrospermopsina: Sistema de Resistência a Multixenobióticos e Ambiente Redox**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

INCA – Associação Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de Câncer de Pele: Melanoma. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>. Acesso em: 23 jan. 2017.

JAIN, P.K. *et al.* Noble Metals on the Nanoscale: Optical and the Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology and Medicine. **Accounts of Chemical Research**, v.41, n.12, p. 1578–1586, 2008.

JAIN, S.; HIRST, D. G.; O'SULLIVAN, J. M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. **The British Journal of Radiology**, v. 85(1010): p.101–113, 2012.

JOHNSTON, H.J. *et al.* A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. **Criticals Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 328-346, 2010.

KALISHWARALAL, K. *et al.* Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 1, p. 51-57, 2009.

- KALYANARAMAN, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, n.1, p.1–6, 2012.
- KHAN, M. S.; VISHAKANTE, G. D; SIDDARAMAIAH H. Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications. **Advances in colloid and interface science**, v. 199-200, p. 44–58, 2013.
- KIM, C. *et al.* Long-term survival in patients with metastatic melanoma treated with DTIC or temozolomide. **Oncologist**, v.15, p. 765–771, 2010.
- KIM, W. Y. *et al.* Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 72, n. 21-22, p. 1279–1284, 2009.
- LA PORTA, C. A. M. Mechanism of drug sensitivity and resistance in melanoma. **Current cancer drug targets**, v. 9, n. 3, p. 391–7, 2009.
- LARESE, F. F. *et al.* Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 493-501, 2011.
- LARESE, F. F. *et al.* Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. **Toxicology**, v. 255, n. 1-2, p. 33–37, 2009.
- LENS, M.B.; EISEN, T. G. Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. **Expert Opin Pharmacother**, v. 4, n. 12, p. 2205- 11, 2003.
- LI, J. J., *et al.* Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles, **Biomaterials**, v. 31, n. 23, p. 5996-6003, 2010.
- LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIEBEL, S. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2), **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 3, p. 479-488, 2015.
- LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 21, p. 4212. 1999.
- LIOU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Research**, v. 44, n. 5, p. 479-496, 2010.
- LIU, W. *et al.* Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319–30, 2010.
- LIU, Z. *et al.* Effects of Internalized Gold Nanoparticles with Respect to Cytotoxicity and Invasion Activity in Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v.9, n.6., 2014
- LÖSCHER, W.; POTSCHKA, H. Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family. **NeuroRx**, v.2, n1, p. 86–98, 2005.

- LUCAS, L. J. *et al.* Aggregation of nanoparticles in endosomes and lysosomes produces surface-enhanced Raman spectroscopy. **J. Nanophoton**, v.9, n. 1, p. 093-094, 2015.
- LUPO, G. *et al.* Anti-angiogenic Therapy in Cancer: Downsides and New Pivots for Precision Medicine. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 519, 2016.
- MACKEY, M. A.; EL-SAYED, M. A. Chemosensitization of Cancer Cells via Gold Nanoparticle-Induced Cell Cycle Regulation. **Photochemistry and photobiology**, v. 90, n. 2, p. 306-312, 2014.
- MELANOMA RESEARCH FOUNDATION. Self-Screening for Melanoma. Disponível em <<https://www.melanoma.org/understand-melanoma/preventing-melanoma/self-screening-guide>>. Acesso em: 20 jan. 2017
- MELANOMA RESEARCH FOUNDATION. The ABCDEs of Melanoma. Disponível em <https://www.melanoma.org/understand-melanoma/diagnosing-melanoma/detection-screening/abcde-melanoma>>. Acesso em: 20 jan. 2017
- MRUK, D. D.; SU, L.; CHENG, C. Y. Emerging role for drug transporters at the blood-testis barrier. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n.2, p. 99–106, 2011.
- NEIBERT, K. *et al.* Wound-Healing with Mechanically Robust and Biodegradable Hydrogel Fibers Loaded with Silver Nanoparticles. **Advanced Healthcare Materials**, v.1, p. 621–630, 2012.
- NI, Z.; MAO, Q. ATP-Binding Cassette Efflux Transporters in Human Placenta. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 674–685, 2011.
- NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v.150, p.5-22, 2007.
- PAN, Y. *et al.* Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. **Small**, v. 3, n. 11, p. 1941–9, 2007.
- PAN, Y. *et al.* Inhibition effects of gold nanoparticles on proliferation and migration in hepatic carcinoma - conditioned HUVECs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, cap.2, p. 679 – 684, 2014.
- PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 282 n. 5, p. 947-970, 2002.
- PÉREZ, S.; LA FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, n.6, 2009.
- PHILLIPS H. J. Dye exclusion test for cell viability, In PF Kruse Jr&MK Patterson Jr (eds), Tissue Culture Methods and Applications, **Academic Press**, New York, p. 406-408, 1973.

POLLOCK, P. M. Melanoma: Cellular and Molecular Abnormalities, In BERTINO, J. R. **Encyclopedia of Cancer**. Segunda Edição. Nova Iorque: Academic Press, 2002, p. 141-152.

PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES (2013). Consumer Products Inventory. Disponível em <<http://www.nanotechproject.org/cpi>>. Acesso em: 24 jan. 2017.

RAVINDRAN, A.; CHANDRAN, P.; KHAN, S. S. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 105, p. 342–52, 2013.

REILLY, T. P. *et al.* Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical pharmacology**, v.55, n.6, p. 803–10, 1998.

REJMAN, J. *et al.* Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **The Biochemical journal**, v. 377, n. 1, p. 159–69, 2004.

ROA, W. *et al.* Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle. **Nanotechnology**, v. 20, n. 37, 2009.

SEATON, A. *et al.* Nanoparticles, human health hazard and regulation. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, p.119–129, 2010.

SIGNORI, A. M. **Desenvolvimento de uma nova metodologia para preparação de nanopartículas de prata estabilizadas pela Polietilenoimina funcionalizada e aplicação em catálise**. Dissertação de mestrado em química, Brasil, 2010.

SNODGRASS, R. G. *et al.* Mitomycin C Inhibits Ribosomal RNA: a novel cytotoxic mechanism for bioreductive drugs. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n.25, 19068–19075, 2010.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, n. 1-3, p. 1881-1896, 2005.

SVENDSEN, C. *et al.* A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, n.1, p. 20–29, 2004.

SWANNER, J. *et al.* Differential cytotoxic and radiosensitizing effects of silver nanoparticles on triple-negative breast cancer and non-triple-negative breast cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 3937–3953, 2015.

SWATHY, J. R. *et al.* Antimicrobial silver: An unprecedented anion effect. **Scientific Reports**, v.4, p.7161, 2014.

SZATROWSKI, T. P.; NATHAN, C. F. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. **Cancer Research**, v. 51, n. 3, p. 794-798, 1991.

TEDESCO, S., *et al.* Gold nanoparticles and oxidative stress in the blue mussel, *Mytilus edulis*. **Oxidative Stress and Nanotechnology: Methods and Protocols**, v. 1028, p. 197-203, 2013.

TEDESCO, S., *et al.* Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 178-186, 2010.

TEIXEIRA ROSA, R.G. **Caracterização de nanopartículas de Bi produzidas por ablação a laser**. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2014.

TORTORELLO, M.L. Total Viable Counts – Microscopy. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Segunda Edição. p. 618–620, 2014.

VAN PHU, D. *et al.* Study on antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by gamma irradiation method using different stabilizers. **Nanoscale Research Letters**, v.9, n.1, p. 162, 2014.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v.54, p. 10–4, 2011.

VIJAYAKUMAR, S.; GANESAN, S. In Vitro Cytotoxicity Assay on Gold Nanoparticles with Different Stabilizing Agents. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

WANG, F. *et al.* Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. **ACS Nano**, v.5, n.5, p. 3679-92, 2011.

WEB OF SCIENCE. Thomson Reuters. Versão 5.13.2. Disponível em <<http://apps.webofknowledge.com/>>. Acesso em: 13 mai. 2014.

XU, W., *et al.* RGD-conjugated gold nanorods induce radiosensitization in melanoma cancer cells by downregulating $\alpha\beta 3$ expression. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 915–924, 2012.

ZHAO, J.; CASTRANOVA, V. Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 14, n. 8, p. 593-632, 2011.